



Hinc patriam sustinet

**Instituto Superior de Agronomia**  
**Universidade Técnica de Lisboa**



## **Análise dos ácidos clorogénicos e avaliação do seu papel na interacção *Coffea arabica* - *Hemileia vastatrix***

**Ana Sofia de Sousa Pinho Leitão**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
**Engenharia Alimentar**

Orientador: Maria Helena Guimarães de Almeida

Co-orientador: Leonor de Castro Esteves Guerra Guimarães

### **Júri:**

Presidente: Doutora Margarida Gomes Moldão Martins, Professora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa

Vogais: Doutora Maria do Rosário Beja Figueiredo Gonzaga Bronze, Professora Auxiliar da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa; Doutora Maria Helena Guimarães de Almeida, Professora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa; Doutor António Eduardo Batista Leitão, Investigador Auxiliar do Centro de Ecofísica, Bioquímica e Biotecnologia Vegetal do Instituto de Investigação Científica Tropical e Doutora Leonor de Castro Esteves Guerra Guimarães, Investigadora Auxiliar do Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro do Instituto de Investigação Científica Tropical

**Lisboa, 2010**

## **Agradecimentos**

A realização deste trabalho foi possível graças à colaboração de várias pessoas e entidades às quais gostaria de expressar os meus reconhecidos agradecimentos:

- Professora Doutora Maria Helena Guimarães de Almeida, do Departamento de Agronomia Tropical do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa, que me proporcionou a realização deste trabalho. Agradeço ainda a forma atenciosa e amiga com que me tratou ao longo deste estudo e da minha passagem pelo Instituto Superior de Agronomia.

- Doutora Leonor Castro Esteves Guerra Guimarães, do Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro, pelo apoio, dedicação e orientação que me ofereceu ao longo de todo o trabalho. Agradeço também a bibliografia que me disponibilizou, o seu apoio na fase de revisão bibliográfica e as suas sugestões e críticas que enriqueceram este trabalho.

- Professora Doutora Maria do Rosário Bronze da Faculdade de Farmácia pelo acompanhamento da parte experimental do trabalho, em especial na HPLC-MS/MS e no tratamento dos resultados.

- Professor Luís Vilas Boas, do Instituto de Biologia e Tecnologia Experimental, pela sua disponibilidade e apoio no tratamento dos resultados e resolução de vários problemas, nomeadamente nos relacionados com a HPLC.

- Carla Alexandra Lopes Graça, do Instituto de Biologia e Tecnologia Experimental, pela disponibilidade que demonstrou em partilhar o seu conhecimento no tratamento dos resultados da HPLC.

- Centro de Investigação de Ferrugens, Instituto de Biologia e Tecnologia Experimental e Faculdade de Farmácia pela disponibilização de recursos materiais e equipamentos indispensáveis à concretização do presente trabalho.

- Gostaria ainda de agradecer à minha família, em especial aos meus pais, pelo interesse e incentivo que demonstraram, desde cedo, pelos meus estudos e ao meu namorado que me acompanhou ao longo de todo o meu curso, pelo seu apoio incondicional que me ajudou a ultrapassar os momentos mais difíceis.

## Resumo

Este trabalho teve como objectivo compreender o papel dos ácidos clorogénicos (CGA) na resposta de resistência do cafeeiro à ferrugem alaranjada (*Hemileia vastatrix*), em particular durante a reacção de hipersensibilidade. Folhas jovens de *Coffea arabica* S4 Agaro, sãs e nas fases iniciais do processo de infecção (interacções compatível e incompatível) foram analisadas por HPLC-DAD-ED e HPLC-MS/MS, após extracção com metanol e água. Os ácidos clorogénicos foram identificados através de MS/MS e quantificados utilizando 3-CQA como padrão externo. Os cromatogramas obtidos apresentaram cerca de 40 picos, onde foram identificados 27 CGA, que corresponderam a cerca de 460 µg/g de folha. Contudo, o teor total de CGA (e de outros compostos identificados) das folhas inoculadas (interacção compatível e incompatível) não apresentou diferenças significativas em relação ao das folhas sãs (controlo). O possível envolvimento dos CGA na resposta de resistência do cafeeiro à *H. vastatrix* só foi evidenciado para os compostos presentes nos picos 7 e 29 (4,5-DiCQA, CFQA, DiFQA, *p*CoFQA, ácido trihidroxicinamoilquínico e um composto não identificado), que aumentaram na interacção incompatível, 30h após inoculação, dos quais o 4,5-DiCQA é, provavelmente, o CGA presente em maior concentração.

Palavras-chave: *Coffea arabica*, *Hemileia vastatrix*, resistência, ácidos clorogénicos, HPLC-DAD-MS/MS

## Abstract

This work aims to understand the role of chlorogenic acids (CGA) in the resistance response of coffee to leaf rust (*Hemileia vastatrix*) particularly during the hypersensitivity reaction. Young leaves of *Coffea arabica* S4 Agaro in the early stages of the infection (compatible and incompatible interactions) were analyzed by HPLC-DAD-ED and HPLC-MS/MS after extraction with methanol and water. Chlorogenic acids were identified by MS/MS and quantified using 3-CQA as an external standard. The chromatograms showed about 40 peaks where 27 CGA were identified, that correspond to about 460 µg/g of leaf. The total content of the CGA and other identified compounds in inoculated leaves (compatible and incompatible interaction) showed no significant differences when compared to the healthy leaves (control). The possible involvement of CGA in the resistance response of coffee to *H. vastatrix* was only evidenced for compounds present in peaks 7 and 29 (4,5-DiCQA, CFQA, DiFQA, *p*CoFQA, trihidroxicinamoilquínico acid and a non identified compound), which increased in the incompatible interaction in the early stages of the infection process (by 30h after inoculation), being 4,5-DiCQA probably the CGA in greater concentration among them.

Keywords: *Coffea arabica*, *Hemileia vastatrix*, chlorogenic acids, resistance, HPLC-DAD-MS/MS

## Extended abstract

The resistance of *Coffea arabica* S4 Agaro to *Hemileia vastatrix* is characterized by a rapid localized plant cell death (hypersensitive reaction-HR), associated with the restriction of fungal growth and early increase in phenylalanine ammonia-lyase (PAL) and peroxidase (POD) activity. This work aims to understand the role of chlorogenic acids (CGA) in the resistance response of coffee to leaf rust (*Hemileia vastatrix*), particularly during the HR. Chlorogenic acids (CGA) are products of phenylpropanoid metabolism. They are a family of esters formed between certain hydroxycinnamic acids and quinic acid. Although 30 different species of CGA have been identified in green coffee beans, the great majority of these compounds are: caffeoylquinic acids (3-, 4- and 5-CQA); dicaffeoylquinic acids (3,4-, 3,5- and 4,5-DiCQA) and feruloylquinic acids (3-, 4- and 5-FQA).

Young *C. arabica* S4 Agaro leaves in the first stages of the infection process of *H. vastatrix* (compatible and incompatible interactions) were collected at different times after inoculation. Fresh leaf tissues were ground in liquid N<sub>2</sub>, and homogenised in 10 ml of methanol 40%. After 30 minutes of agitation (125 rpm) at 4 °C, samples were centrifuged at 10 000 g for 5 minutes at 4 °C. Supernatant was collected and transferred to 50 ml flask. The extraction of the pellet was repeated three more times and the supernatants were collected and treated with Carrez reagent. The volume of the 50 ml flask was completed with methanol 40%. After a 15 minutes rest the extracts were filtered and analyzed by HPLC-DAD-ED and HPLC-MS/MS.

HPLC-DAD was performed in a Thermo Finnigan equipment (Surveyor model). The chlorogenic acids separation was achieved in a RP-18 (5 µm) 250 × 4 mm Lichrocart<sup>®</sup> (Merck) column and detection was performed at 325 nm. A gradient of eluents was used for analysis (eluent A: water:phosphoric acid (999:1 v/v) and eluent B: water:acetonitrile:phosphoric acid (599:400:1 v/v)) at a flow rate of 700 µL/min. For LC-MS analysis a system (Alliance, Waters 2695 Separation Module) with a photodiode array detector (Waters 2996) in tandem with a TQ mass spectrometer (Micromass Quattro Micro API) and an ESI source operating in negative mode was used.

The HPLC-DAD analysis of coffee leaf extracts produced chromatograms with more than 40 peaks (detected at 325 nm) where 27 CGA were identified, that correspond to about 460 µg/g of leaf. For CGA identification MS data were compared with the ones from the literature, as for most compounds standards are not commercially available. Chlorogenic acid (3-CQA) was used as external standard to determine CGA content of leaf extracts. No differences were observed when the overall CGA (and other identified compounds) content of healthy leaves were compared with the inoculated ones (incompatible and compatible interactions). However, six chlorogenic acids (4,5-DiCQA, CFQA, DiFQA, pCoFQA,

trihidroxicinamoylquinic acid) and a non identified compound, present in peaks 7 and 29, increased significantly 30 hours after inoculation in the incompatible interaction, and this was not observed in the compatible nor in the control, being 4,5-DiCQA probably the CGA in greater concentration. CGA can be substrate of peroxidases, leading to polymerization products such as insoluble brown pigments and lignin, that contribute to the plant defense mechanisms. As previously referred the resistance of *Coffea arabica* S4 Agaro to *Hemileia vastatrix* is characterized by a rapid localized plant cell death (HR), monitored by cell autofluorescence and/or browning, which indicate accumulation of phenolic compounds. Thus, the differential accumulation of the CGA present in peaks 7 and 29 during the time course of the experience, may suggest the possible involvement of those compounds in the resistance of coffee against *H. vastatrix*.

## Índice

Introdução Geral .....	1
1. O cafeeiro e o café .....	1
1.1. Origem e expansão .....	1
1.2. Classificação sistemática e características gerais.....	1
1.3. Importância económica e produção mundial de café.....	2
1.4. Tecnologia do café.....	4
1.5. Os ácidos clorogénicos no café .....	7
2. A ferrugem alaranjada ( <i>Hemileia vastatrix</i> ).....	9
2.1.Origem, distribuição geográfica e importância económica.....	9
2.2. Classificação sistemática.....	9
2.3. Ciclo de vida .....	10
2.4. Processo de infecção .....	10
2.5. Meios de combate.....	11
3. Considerações gerais sobre as interacções planta – agente patogénico.....	11
3.1. Compostos fenólicos envolvidos na defesa das plantas - Ácidos clorogénicos ..	12
3.2. Interação cafeeiro-ferrugem alaranjada (respostas de defesa).....	13
4. Métodos usados na análise de ácidos clorogénicos .....	15
4.1. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC).....	15
4.2. Espectrometria de Massa (MS) .....	16
5. Parte Experimental.....	17
5.1. Material e Métodos .....	17
5.1.1. Material Biológico .....	17
5.1.2. Inoculação dos cafeeiros .....	18
5.1.3. Reagentes e preparação de soluções .....	18
5.1.4. Equipamento .....	19
5.1.5. Preparação das amostras e metodologia de extracção .....	22
5.1.6. Tratamento dos dados.....	23

5.2. Resultados e discussão.....	23
5.2.1. Análise do extracto de semente .....	24
5.2.2. Comparação dos dois métodos de extracção estudados .....	24
5.2.3. Repetibilidade dos métodos de extracção e de análise por HPLC.....	27
5.2.4. Identificação dos ácidos clorogénicos e de outros compostos nos extractos de folha.....	28
5.2.5. Quantificação dos ácidos clorogénicos na interacção <i>C. arabica</i> – <i>H. vastatrix</i> ...	33
6. Conclusões.....	41
7. Anexos .....	42



## Lista de Figuras

Figura 1 – Distribuição da produção mundial de café em 2009.....	3
Figura 2 – Distribuição da produção mundial de café por regiões geográficas em 2008 .....	3
Figura 3 – Produção mundial de café (t) entre 1998 e 2008 .....	4
Figura 4 – Fruto do cafeeiro.....	4
Figura 5 – Principais ácidos clorogénicos presentes no grão de café .....	8
Figura 6 – Representação do ciclo de vida da <i>Hemileia vastatrix</i> .....	10
Figura 7 - Síntomas de susceptibilidade (A - pústulas uredospóricas) e de resistência (B1 - pontuações cloróticas e B2 - tumefacção) de <i>C. arabica</i> à <i>H. vastatrix</i> .....	14
Figura 8 – Esquema do quadrupolo .....	17
Figura 9 – Espectro de absorção do ácido clorogénico (3-CQA) .....	21
Figura 10 – Cromatograma, a 325 nm, do extracto de sementes de <i>Coffea arabica</i> S4 Agaro com a identificação dos picos referentes aos ácidos clorogénicos, por comparação com a literatura .....	24
Figura 11 - Perfis cromatográficos, a 325 nm, do extracto de folha obtido pelo método de Correia (1990) (a vermelho) e Ky <i>et al.</i> (1997) (a preto) .....	25
Figura 12 - Cromatogramas, a 325 nm, do extracto de semente (a vermelho) e de folha (a preto), obtido pela metodologia de Correia (1990).....	25
Figura 13 – Espectros de absorção (200 a 400 nm) do pico do 3,5-DiCQA presente no cromatograma do extracto de semente (a verde) e no do extracto de folha preparado com o método de Ky <i>et al.</i> (1997) (a preto) (IS=0,980).....	27
Figura 14 - Espectros de absorção (200 a 400 nm) do pico do 5-FQA presente no cromatograma do extracto de semente (a verde) e no do extracto de folha preparado com o método de Correia (1990) (a preto) (IS=0,697) .....	27
Figura 15 - Cromatograma, a 325 nm, de um dos extractos de folha com a numeração dos picos.....	29
Figura 16 – Cromatograma obtido através do ED de um dos extractos de folha .....	29
Figura 17 – Projecção das amostras C (controlo), R (resistente) e S (susceptível) do grupo <i>am</i> (0, 24, 30, 48 e 72 horas após inoculação) do segundo ensaio, no espaço definido pela primeira e terceira componentes principais.....	37
Figura 18 - Projecção das amostras e C (controlo), R (resistente) e S (susceptível) e das 40 variáveis do grupo <i>am</i> (0, 24, 30, 48 e 72 h após inoculação) do segundo ensaio, no espaço definido pela primeira e terceira componentes principais .....	38

Figura 19 - Concentração dos compostos que co-eluem no pico 29 (4,5-DiCQA, CFQA, DiFQA e pCoFQA) nas amostras C (controlo), R (resistente) e S (susceptível), entre as 0 e 72h após inoculação (cada valor representa a média $\pm$ o desvio padrão) .....	39
Figura 20 - Concentração dos compostos presentes no pico 7 (ácido trihidroxicinamoilquínico, CFQA e composto não identificado) dos cromatogramas das amostras C (controlo), R (resistente) e S (susceptível), entre as 0 e 72h após inoculação (cada valor representa a média $\pm$ o desvio padrão).....	40
Figura 21 – Esquema da via fenilpropanóide. C4H - cinamato 4-hidrolase, 4CL - 4-hidroxicinamoil-CoA ligase, CoA - co-enzima A, HCT - hidroxicinamoil-CoA shikimato/quinato hidroxicinamoil transferase, HQT - hidroxicinamoil-CoA quinato hidroxicinamoil transferase, C3H - <i>p</i> -cumarato 3-hidrolase, CCoAOMT - cafeoil-CoA o-metiltransferase .....	43
Figura 22 – Curva de calibração obtida a partir das áreas dos cromatogramas a 325 nm das soluções padrão de 3-CQA, com a respectiva equação de regressão e coeficiente de determinação.....	44
Figura 23 - Curva de calibração obtida a partir das áreas dos cromatogramas a 254 nm das soluções padrão de 3-CQA, com a respectiva equação de regressão e coeficiente de determinação.....	44
Figura 24 - Projecção das amostras C (controlo), R (resistente) e S (susceptível) do primeiro ensaio no espaço definido pelas 3 componentes principais.....	49
Figura 25 - Projecção das amostras C (controlo), R (resistente) e S (susceptível) do primeiro ensaio no espaço definido pela primeira e segunda componentes principais.....	49
Figura 26 - Projecção das amostras C (controlo), R (resistente) e S (susceptível) do segundo ensaio no espaço definido pelas 3 componentes principais.....	50
Figura 27 – Projecção das amostras C (controlo), R (resistente) e S (susceptível) do segundo ensaio no espaço definido pela primeira e segunda componentes principais .....	50
Figura 28 - Projecção das amostras C (controlo), R (resistente) e S (susceptível) do terceiro ensaio no espaço definido pelas 3 componentes principais.....	51
Figura 29 – Projecção das amostras C (controlo), R (resistente) e S (susceptível) do terceiro ensaio no espaço definido pela primeira e segunda componentes principais.....	51
Figura 30 - Projecção das amostras C (controlo), R (resistente) e S (susceptível) do grupo <i>pm</i> (12, 17, 24, 36 e 42h após inoculação) do primeiro ensaio, no espaço definido pela primeira e segunda componentes principais.....	52
Figura 31 - Projecção das amostras C (controlo), R (resistente) e S (susceptível) do grupo <i>pm</i> (12, 17, 24, 36 e 42h após inoculação) do primeiro ensaio, no espaço definido pela primeira e terceira componentes principais.....	52

Figura 32 - Projecção das amostras C (controlo), R (resistente) e S (susceptível) do grupo <i>am</i> (0, 24, 30, 48 e 72h após inoculação) do primeiro ensaio, no espaço definido pela primeira e segunda componentes principais.....	53
Figura 33 - Projecção das amostras C (controlo), R (resistente) e S (susceptível) do grupo <i>am</i> (0, 24, 30, 48 e 72h após inoculação) do primeiro ensaio, no espaço definido pela primeira e terceira componentes principais.....	53
Figura 34 - Projecção das amostras C (controlo), R (resistente) e S (susceptível) do grupo <i>pm</i> (12, 17, 24, 36 e 42h após inoculação) do segundo ensaio, no espaço definido pela primeira e segunda componentes principais.....	54
Figura 35 - Projecção das amostras C (controlo), R (resistente) e S (susceptível) do grupo <i>pm</i> (12, 17, 24, 36 e 42h após inoculação) do segundo ensaio, no espaço definido pela primeira e terceira componentes principais.....	54
Figura 36 - Projecção das amostras C (controlo), R (resistente) e S (susceptível) do grupo <i>am</i> (12, 17, 24, 36 e 42h após inoculação) do segundo ensaio, no espaço definido pela primeira e segunda componentes principais.....	55
Figura 37 - Projecção das amostras C (controlo), R (resistente) e S (susceptível) e das 40 variáveis do grupo <i>pm</i> (12, 17, 24, 36 e 42h após inoculação) do primeiro ensaio, no espaço definido pela primeira e segunda componentes principais .....	56
Figura 38 - Projecção das amostras C (controlo), R (resistente) e S (susceptível) e das 40 variáveis do grupo <i>pm</i> (12, 17, 24, 36 e 42h após inoculação) do primeiro ensaio, no espaço definido pela primeira e terceira componentes principais .....	56
Figura 39 - Projecção das amostras C (controlo), R (resistente) e S (susceptível) e das 40 variáveis do grupo <i>am</i> (0, 24, 30, 48 e 72h após inoculação) do primeiro ensaio, no espaço definido pela primeira e segunda componentes principais .....	57
Figura 40 - Projecção das amostras C (controlo), R (resistente) e S (susceptível) e das 40 variáveis do grupo <i>am</i> (0, 24, 30, 48 e 72h após inoculação) do primeiro ensaio, no espaço definido pela primeira e terceira componentes principais .....	57
Figura 41 - Projecção das amostras C (controlo), R (resistente) e S (susceptível) e das 40 variáveis do grupo <i>pm</i> (12, 17, 24, 36 e 42h após inoculação) do segundo ensaio, no espaço definido pela primeira e segunda componentes principais .....	58
Figura 42 - Projecção das amostras C (controlo), R (resistente) e S (susceptível) e das 40 variáveis do grupo <i>pm</i> (12, 17, 24, 36 e 42h após inoculação) do segundo ensaio, no espaço definido pela primeira e terceira componentes principais .....	58
Figura 43 - Projecção das amostras C (controlo), R (resistente) e S (susceptível) e das 40 variáveis do grupo <i>am</i> (0, 24, 30, 48 e 72h após inoculação) do segundo ensaio, no espaço definido pela primeira e segunda componentes principais .....	59

## Lista de Quadros

Quadro 1 – Raças fisiológicas, origem e genes de virulência dos isolados de <i>H. vastatrix</i> utilizados .....	17
Quadro 2 – Tempos de colheita para as inoculações <i>am</i> e <i>pm</i> .....	18
Quadro 3 - Gradientes dos eluentes A e B usados no método de análise .....	20
Quadro 4 - Índices de semelhança entre os espectros de absorção dos picos do extracto de semente e os dos picos dos extractos de folha, obtidos pelos dois métodos utilizados.....	26
Quadro 5 - Análise da repetibilidade do método cromatográfico e do método de extracção.	28
Quadro 6 - Tempo de retenção, <i>m/z</i> , comprimento de onda máximo e identificação de compostos nos cromatogramas dos extractos de folha de cafeeiro .....	31
Quadro 7- Concentração média dos ácidos clorogénicos (e de outros compostos que co-eluem nos picos destes ácidos) identificados nas amostras C (controlo), R (resistente) e S (susceptível) .....	34
Quadro 8 - Variações acumuladas nas três primeiras componentes principais (CP), pelo modelo ACP, para os 3 ensaios e grupos <i>am</i> e <i>pm</i> .....	36
Quadro 9 – Valores de <i>eigenvalue</i> correspondentes às três primeiras componentes principais (CP), pelo modelo ACP, para os 3 ensaios e grupos <i>am</i> e <i>pm</i> .....	36
Quadro 10 – Limites de detecção e quantificação de 3-CQA para as curvas de calibração obtidas a 325 e 254 nm .....	44
Quadro 11 – Tentativa de identificação dos compostos responsáveis pelos picos cromatográficos, com base nos respectivos tempos de retenção ( <i>t<sub>R</sub></i> ), comprimento de onda máximo ( $\lambda_{\text{max}}$ ) e <i>m/z</i> .....	46
Quadro 12 - Caracterização espectrométrica dos ácidos clorogénicos e outros compostos identificados.....	48

## Lista de abreviaturas e siglas

ANOVA – Análise de variância  
APCI – Atmospheric pressure chemical ionization (ionização à pressão atmosférica)  
CCoAOMT – Caffeoyl-CoA o-methyltransferase  
CFQA - Ácidos cafeoylferuloylquinic  
CGA – Ácidos clorogénicos  
CIFC – Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro  
CoA – Co-enzima A  
CP – Componente principal  
CQA – Ácidos cafeoylquinic  
C3H – *p*-cumarate 3-hydrolase  
C4H – Cinnamate 4-hydrolase  
DiCQA – Ácidos dicafeoylquinic  
DiFQA - Ácidos diferuloylquinic  
ED – Electrochemical detector (detector electroquímico)  
ESI – Electron impact source (fonte de impacto de electrões)  
FAO – Food and Agriculture Organization (Organização dos Alimentos e da Agricultura)  
*ft* – *flecks* com tumefacção  
FQA – Ácidos feruloylquinic  
GC – Gas chromatography (cromatografia gasosa)  
HCT – Hydroxycinnamoyl-CoA shikimate/quinic hydroxycinnamoyl transferase  
HPLC – High performance liquid chromatography (cromatografia líquida de alta eficiência)  
HPLC-MS - High performance liquid chromatography – mass spectrometry (cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa)  
HQT – Hydroxycinnamoyl-CoA quinic hydroxycinnamoyl transferase  
HR – Hypersensitive reaction (reacção de hipersensibilidade)  
ICO – International Coffee Organization (Organização Internacional do Café)  
LDL – Low density lipoproteins (lipoproteínas de baixo peso molecular)  
LOX - Lipoxigenases  
*m/z* – Mass-to-charge ratio (razão entre a massa e carga)  
MS – Espectrometria de massa  
*p.a.* – para análise  
PAL – phenylalanine ammonia-lyase (fenilalanina amónia liase)  
PCA – Principal component analysis (análise por componentes principais)  
*p*CoCQA - Ácidos *p*-cumaroylcafeoylquinic  
*p*CoFQA - Ácidos *p*-cumaroylferuloylquinic

*p*CoQA - Ácidos *p*-cumaroilquínicos

POD - Peroxidases

PRP – Pathogenesis-related proteins (proteínas relacionadas com a patogenicidade)

RME – Repetibilidade do método de extracção

RMC – Repetibilidade do método cromatográfico

ROS – Reactive oxygen species (formas reactivas de oxigénio)

SOD – Superoxide dismutase (superóxido dismutase)

S/R – Relação sinal/ruído

TQ – triplo quadropolo

TOC – Total organic carbon (carbono orgânico total)

$t_R$  – Tempo de retenção

uA – unidades de área

UA – Unidades de absorvância

UV/VIS – radiação ultravioleta e visível

$\lambda_{max}$  – Comprimento de onda máximo

4CL – 4-hidroxicinamoil-CoA ligase

## **Introdução Geral**

### **1. O cafeeiro e o café**

#### **1.1. Origem e expansão**

O cafeeiro arábica (*Coffea arabica*) é originário das regiões montanhosas da Abissínia (Etiópia) (Ferrão, 2005). Não existem certezas em relação à data da sua descoberta, mas pensa-se que o seu cultivo possa ter começado em 575 (Smith, 1985). Outras espécies de cafeeiros só foram descobertas muito mais tarde, também em África, sendo a história da sua difusão menos conhecida (Ferrão, 2005).

O café difundiu-se pelo mundo Árabe através de peregrinos que levavam grãos de café para se manterem mais activos durante as longas viagens até Meca. Assim que o conhecimento dos efeitos do café se generalizou, os Árabes interessaram-se pela sua cultura, difusão e comercialização. Os povos islâmicos difundiram o cafeeiro pela Ásia e África (Ferrão, 2005).

Os europeus conheceram o cafeeiro pela primeira vez através de uma descrição feita por Rauwolf em 1538, embora já conhecessem a bebida há muito mais tempo. O primeiro cafeeiro chegou à Europa através dos Holandeses em 1690 ou 1699. Mais tarde, em 1714, após o tratado de Utreque, o Burgomestre da cidade de Amesterdão ofereceu um cafeeiro ao Rei Luís XIV, em sinal de amizade, que o colocou nos *Jardins de Plantes*, em Paris, então dirigido pelo botânico Jussieu (Ferrão, 2005).

A introdução do cafeeiro no continente americano encontra-se pouco documentada e não há certezas de quem lá terá introduzido as primeiras plantas, se os franceses ou os holandeses. Sabe-se que foram enviados cafeeiros de Amesterdão para o Suriname em 1718 e que nesse mesmo ano os franceses também enviaram plantas para a Ilha de Bourbon (Ferrão, 2005). Em 1730 já existiam culturas de cafeeiro no Haiti, Jamaica, Cuba e Brasil. Em 1825 o Brasil era já o maior produtor mundial de café (Sivetz & Desrosier, 1979).

Em 1962, foi criada em Londres, a Organização Internacional do Café de países produtores e consumidores (ICO, International Coffee Organization), com o objectivo de estabilizar o comércio internacional, impondo quotas de exportação e controlando assim a produção (Smith, 1985).

#### **1.2. Classificação sistemática e características gerais**

Dentro do género *Coffea* apenas duas espécies têm importância económica, *C. arabica* e *C. canephora*, as quais representaram em 2009, respectivamente, 61 e 39% da produção mundial (ICO Annual Review, 2008/09).

A primeira descrição do cafeeiro arábica foi realizada por A. de Jussieu, em 1713, sob o nome *Jasminum arabicanum*, com base em apenas uma planta do jardim botânico de

Amsterdão. Mais tarde (1737) Linnaeus classificou o cafeeiro como *Coffea arabica*, criando o novo género *Coffea* (Charrier & Berthaud, 1985).

Na classificação taxonómica do género *Coffea* é de salientar o trabalho de Chevalier (1947), que conseguiu construir uma chave taxonómica bastante completa, baseando-se essencialmente nas características morfológicas e na distribuição geográfica das espécies (Chevalier, 1947).

Com a evolução da taxonomia, que recorre actualmente à análise de dados citotaxonómicos, citogenéticos, moleculares, ecológicos, geográficos, bioquímicos e serológicos, têm sido propostos, entretanto, outros sistemas de classificação alternativos ao de Chevalier.

Actualmente classifica-se o género *Coffea* como pertencendo à família *Rubiaceae*, inserindo-se na subfamília *Ixoroideae* e na tribo *Coffeae* (Davis *et al.*, 2006). Este género encontra-se subdividido em dois subgéneros, *Coffea* e *Baracoffea*, embora a maioria das espécies conhecidas, como *C. arabica* e *C. canephora*, estejam incluídas no primeiro. A maioria das espécies pertencentes a estes subgéneros ocorre naturalmente em África, Madagáscar e nas Ilhas Mascarenhas, enquanto as incluídas no subgénero *Baracoffea* se encontram restritas às florestas secas do Oeste do Madagáscar (Davis *et al.*, 2006).

Com o decorrer dos estudos taxonómicos e a contínua descoberta de novas espécies é provável que a classificação seja novamente alterada.

Apesar de pertencerem ao mesmo sub-género, *C. arabica* e *C. canephora* apresentam inúmeras diferenças entre si. Enquanto *C. canephora* e as outras espécies de cafeeiros são diplóides (apresentam 22 cromossomas), *C. arabica* é tetraplóide, (possuindo 44 cromossomas) (Rodrigues Jr. *et al.*, 1975). Os cafeeiros Arábica são, em geral, mais susceptíveis ao ataque de pragas e doenças, desenvolvem-se melhor a temperaturas amenas (15 a 24 °C) e altitudes elevadas (1000 a 2000 m). Já os cafeeiros Robusta são mais resistentes a pragas e doenças, preferem temperaturas mais altas (24 a 30 °C) e altitudes até 700 metros (Wilson, 1985). Quanto às características da bebida, o café Arábica contém menor teor em cafeína, é mais ácido e aromático que o café Robusta, que tem maior teor de cafeína, é conseqüentemente mais amargo e possui mais corpo (Sivetz & Desrosier, 1979).

### **1.3. Importância económica e produção mundial de café**

O cultivo, processamento, transporte e comercialização do café empregam centenas de milhões de pessoas em todo o mundo. O café é um dos mais valiosos produtos primários no comércio mundial, sendo o segundo mais valioso em termos monetários, apenas ultrapassado pelo petróleo. A produção de café é crucial para a economia e política dos



países em vias de desenvolvimento representando, para muitos deles, mais de metade do valor das suas exportações ([http://www.ico.org/coffee\\_story.asp](http://www.ico.org/coffee_story.asp)).

Segundo a ICO, a produção mundial em 2009 terá sido cerca de 7,4 milhões de toneladas, com o Brasil a liderar (com cerca de 32 % da produção mundial), seguido pelo Vietname, Indonésia e Colômbia (figura 1).

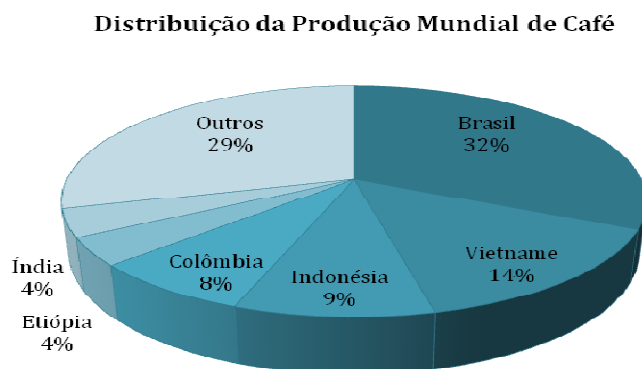


Figura 1 – Distribuição da produção mundial de café em 2009 (ICO Anual Review, 2008/09)

A principal região produtora de café é a América do Sul que, em 2008, representou quase 50 % da produção mundial (figura 2).

**Distribuição da Produção de Café por Regiões em 2008**

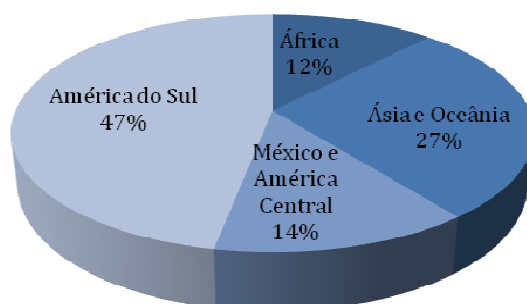


Figura 2 – Distribuição da produção mundial de café por regiões geográficas em 2008 (ICO Anual Review, 2008/09)

Segundo dados da FAO (<http://www.fao.org>) a produção mundial de café tem crescido nos últimos anos. É evidente na figura 3 a alternância entre produções anuais mais elevadas (safra) e mais reduzidas (contra-safra), característica da cultura do café.

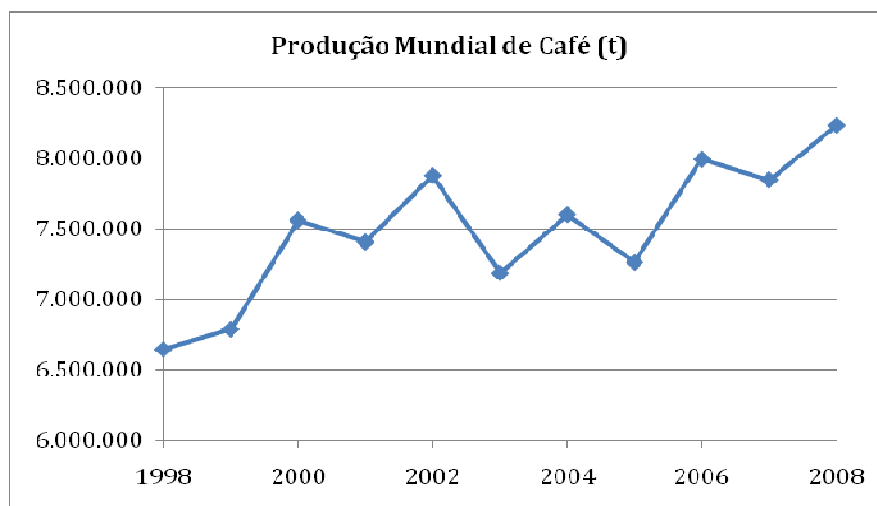


Figura 3 – Produção mundial de café (t) entre 1998 e 2008 (<http://www.fao.org>)

#### 1.4. Tecnologia do café

O fruto é a parte da planta que justifica a grande expressão da cafeicultura (figura 4). Dele se extrai a semente que vai dar origem à tão apreciada e valorizada bebida.

A tecnologia do café engloba o conjunto de operações que visam a obtenção do grão de café, sob a forma de café comercial, e que começa logo após a colheita do fruto (“cereja”).



Figura 4 – Fruto do cafeeiro

As técnicas utilizadas durante a colheita dos frutos, vão condicionar o tipo de tecnologia aplicada, assim como a qualidade do produto final. A colheita manual é a mais vantajosa, pois permite controlar a qualidade do material colhido. Existem três técnicas de colheita manual: colheita seleccionada, ripagem e colheita de rebusco. A primeira técnica consiste na colheita exclusiva de frutos perfeitamente maduros, envolvendo, pois, maiores custos de mão-de-obra. Esta técnica dá origem a um produto de qualidade superior ao obtido utilizando as outras duas técnicas referidas. A ripagem consiste em “pentear” cuidadosamente os ramos produtivos do cafeeiro com os dedos, arrastando os frutos que se vão soltando e evitando destacar os que oferecem maior resistência (menos maduros). A colheita de rebusco é semelhante à ripagem mas, neste caso, todos os frutos são colhidos, independentemente do seu estado de maturação, sendo também colhidas muitas folhas. Esta técnica encontra-se associada a um produto de menor qualidade (Correia, 1990).

A tecnologia pós-colheita, a que os frutos são submetidos nos países produtores, pode ser realizada por duas vias: a via húmida e a via seca. A via húmida é uma técnica mais

cara que só pode ser utilizada quando existe grande disponibilidade de água potável (Sivetz & Desrosier, 1979). Os frutos utilizados nesta via têm que estar perfeitamente maduros e por isso é aplicada preferencialmente a colheita seleccionada. Como utiliza uma matéria-prima de qualidade superior, esta via origina geralmente um café de maior qualidade (conhecido comercialmente por café *mild* ou lavado). Este processo começa com a recepção e selecção, realizadas num tanque (ou outro recipiente) com água, onde as cerejas, em diferentes estados de maturação, são separadas por diferença de densidade. Os materiais estranhos são também removidos nesta etapa da mesma forma (Clarke, 1979). Os frutos em perfeito estado de maturação, assim como as impurezas mais pesadas, depositam-se no fundo do tanque enquanto os frutos verdes e sobremaduros (café “bóia”), folhas, paus e outras impurezas mais leves flutuam. Os frutos recolhidos à superfície do tanque são encaminhados para a via seca enquanto as cerejas depositadas no fundo seguem para despulpadores, onde a polpa é extraída, resultando o grão envolvido pelo endocarpo (“pergaminho”). O grão encontra-se ainda envolvido por uma camada de mucilagem, insolúvel em água, que tem que ser removida pois dificulta a posterior secagem. O método mais comum de remoção da mucilagem é através de fermentação natural, durante a qual a mucilagem, composta essencialmente por pectina, protopectina e esterres pectínicos, é degradada por enzimas pécicas provenientes inicialmente da própria mucilagem e depois produzidas por leveduras e bactérias presentes no tanque de fermentação, onde entretanto, se multiplicaram. Para acelerar a fermentação pode ser feita a adição de enzimas. A remoção da mucilagem pode também ser realizada por métodos químicos, físicos e com água quente, que têm a vantagem de serem mais rápidos que o método de fermentação natural. Antes da operação de secagem as sementes podem ou não ser lavadas e o café obtido por este processo designa-se café “pergaminho”. A secagem, efectuada ao sol (secagem natural) ou em secadores (secagem artificial), deve ser realizada até as sementes atingirem cerca de 12% de humidade.

A via seca é um processo mais antigo e simples que consiste, essencialmente, na secagem das “cerejas”. A secagem pode, contudo, ser precedida por lavagem ou selecção a seco e calibração. Na primeira operação, as cerejas maduras são separadas das verdes e das atacadas por pragas ou doenças. Antes da secagem é conveniente realizar-se a calibração dos frutos para se obter uma secagem uniforme dos mesmos. A secagem, tal como na via húmida, pode ser natural ou artificial. As “cerejas” secas obtidas por este processo designam-se café “coco” (Clarke, 1985).

As operações de benefício começam com a secagem que só é realizada quando o café apresenta um teor de humidade superior ao valor de segurança (13%). A operação seguinte é a limpeza que tem como objectivo eliminar impurezas e corpos estranhos que possam

danificar o equipamento de descasque utilizado na operação seguinte. No descasque remove-se o endocarpo (café pergaminho) ou o exocarpo (café coco). O polimento é uma operação que visa melhorar o aspecto do café e só é realizada em cafés de qualidade superior. De seguida realiza-se a calibração (por tamanho e forma) e a catação, operação na qual se removem sementes defeituosas e matérias estranhas que ainda possam existir (Sivetz & Desrosier, 1979). Por fim segue-se o armazenamento que pode ser feito em armazéns nos países produtores ou nos países de destino do produto. Durante o transporte e armazenamento do café a temperatura deve ser mantida abaixo dos 25 °C e a humidade do produto inferior a 13%, para prevenir o ataque de pragas e doenças, nomeadamente, fungos. Para evitar o ataque de insectos, que danificam os grãos de café durante o transporte e armazenamento, devem ser mantidas boas condições de higiene nestas etapas (Clarke, 1985).

Após transporte, o café chega às unidades de processamento onde vai ser torrado. Antes da torra o café tem que ser limpo para remover pó e outros materiais estranhos que possam existir. De seguida o café é loteado e torrado. O loteamento pode ser realizado antes ou depois da torra e é feito com base no gosto dos consumidores, nacionais ou regionais (Clarke, 1985). A torra do café consiste em submetê-lo a uma determinada temperatura durante um certo período de tempo, normalmente à pressão atmosférica. A intensidade da torra vai depender do gosto do consumidor final e também do tipo de café. Aos cafés Arábica, mais aromáticos, é geralmente aplicada uma torra menos intensa que aos Robusta. Durante a torra, os grãos de café perdem água e massa, aumentam de volume, escurecem e ocorre o desenvolvimento dos compostos voláteis responsáveis pelo *flavour* característico do café. A intensidade da torra é habitualmente avaliada qualitativamente pela cor dos grãos (cores mais escuras indicam torras mais intensas). Outras formas de avaliar a intensidade da torra é através da perda de massa e da quantificação de ácidos clorogénicos e trigonelina no grão, cuja perda é tanto maior quanto mais intensa esta for (Sivetz & Desrosier, 1979). Após a torra, o café deve ser arrefecido rapidamente para que não ocorra a sobretorra. O café torrado pode ser comercializado moído ou inteiro, pode ser transformado em café solúvel ou ainda descafeinado (Sivetz & Desrosier, 1979).

O café solúvel é feito geralmente com café Robusta. O seu processo de fabrico começa com a moenda do café e preparação de um extracto aquoso, que é posteriormente concentrado e seco, obtendo-se assim o café solúvel. A secagem pode ser realizada por evaporação ou *spray drying* ou por congelação (liofilização ou *freeze drying*). No entanto, o melhor método é a liofilização, no qual a água do extracto é eliminada por congelação, não havendo assim perdas de compostos voláteis pela acção do calor (Clarke, 1985).

A descafeínização do café, pode ser realizada por solvente, por água (contacto com solução aquosa de composição idêntica à do grão de café mas sem cafeína, ocorrendo a saída desta do grão para a solução por osmose) ou através de fluidos em estado supercrítico.

O café, quer seja em grão, moído, descafeinado ou solúvel, deve ser acondicionado em embalagens que garantam a manutenção das suas características, nomeadamente do seu *flavour*. As embalagens devem, por isso, constituir barreira à entrada de humidade e oxigénio e saída de compostos voláteis do café, podendo, preferencialmente, promover a saída de dióxido de carbono formado durante a torra (Sivetz & Desrosier, 1979).

### **1.5. Os ácidos clorogénicos no café**

Ácidos clorogénicos (CGA) é o nome vulgarmente atribuído a uma família de esteres formados entre determinados ácidos trans-cinâmicos, como os ácidos cafeico e ferúlico, e o ácido quínico (Lepelley *et al.*, 2007).

O grão de café é especialmente rico nestes ácidos (mais de 30), que são os principais constituintes da fracção fenólica do grão. A maior parte destes compostos pertence aos seguintes grupos: ácidos cafeoilquínicos (3-, 4- e 5-CQA); ácidos dicafeoilquínicos (3,4-DiCQA, 3,5-DiCQA e 4,5-DiCQA) e ácidos feruloilquínicos (3-, 4- e 5-FQA) (figura 5). Os restantes são ácidos diferuloilquínicos (DiFQA), *p*-cumaroilquínicos (*p*CoQA), cafeoilferuloilquínicos (CFQA), *p*-cumaroilcafeoilquínicos (*p*CoCQA) e *p*-cumaroilferuloilquínicos (*p*CoFQA) (Clifford *et al.*, 2006a), entre outros.

Os CQA, DiCQA e FQA no grão de café constituem cerca de 98% dos ácidos clorogénicos (Campa *et al.*, 2005). Nesta fracção os referidos ácidos representam, respectivamente, cerca de 80, 15 e 5% em *C. arabica*, e 67, 20 e 13% em *C. canephora* (Ky *et al.*, 2001). Os valores apresentados representam apenas uma média, já que o conteúdo em CGA no grão depende não só da espécie, mas também da variedade do cafeeiro (Ky *et al.*, 1999).

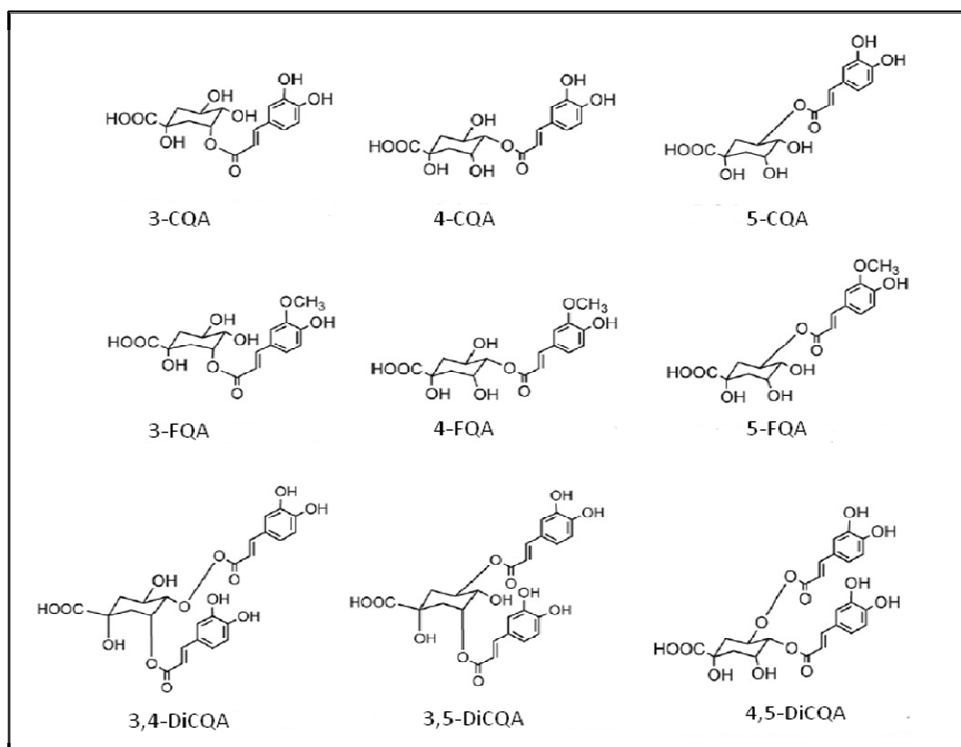


Figura 5 – Principais ácidos clorogénicos presentes no grão de café (Stalmach *et al.*, 2006)

O conteúdo em CGA pode ser usado para caracterizar grãos de café verde e torrado de diferentes variedades e qualidades. Este conteúdo, em conjunto com o de cafeína, tem sido usado para caracterizar cafés comerciais e não comerciais, detectando possíveis fraudes, e também para avaliar o grau de torra dos grãos (Bicchi *et al.*, 1995).

Estes compostos encontram-se também presentes na bebida, sendo importantes para a sua qualidade e aceitabilidade, já que participam na formação da cor, aroma e *flavour* dos grãos de café durante a torra (Belay & Gholap, 2009).

O processo e condições de torra têm uma forte influência na composição quantitativa e qualitativa em CGA, que se deve à instabilidade térmica destes compostos. Torras muito intensas podem levar a degradação quase completa destes ácidos em derivados fenólicos, podendo estas perdas atingir os 95%. O conteúdo total de CGA no grão torrado pode variar entre 0,5 e 7%. Grãos de café sujeitos a torras pouco intensas a intermédias, possuem um conteúdo em CGA que supera o da maioria dos outros alimentos (Farah & Donangelo, 2006).

Além do seu contributo para as características organolépticas da bebida, estes compostos conferem-lhe também um carácter funcional, apresentando várias propriedades benéficas para a saúde humana, derivadas da sua elevada actividade antioxidante.

Nomeadamente, estudos *in vitro* e num modelo *ex vivo* revelaram que o 5-CQA possui um efeito protector contra a oxidação de lipoproteínas de baixo peso molecular (LDL). A oxidação das LDL encontra-se envolvida na formação da placa aterosclerótica que conduz à doença cardiovascular (Stalmach *et al.*, 2006).

## **2. A ferrugem alaranjada (*Hemileia vastatrix*)**

### **2.1. Origem, distribuição geográfica e importância económica**

A ferrugem do café, vulgarmente conhecida como ferrugem alaranjada, é uma doença provocada pelo fungo *Hemileia vastatrix*. Admite-se que este fungo seja provavelmente originário da Etiópia, tal como o cafeeiro arábica, tendo sido observado pela primeira vez perto do Lago Vitória no Quénia (Rodrigues Jr. *et al.*, 1975). O estudo desta doença começou a ganhar interesse após esta ter destruído a indústria do café no Ceilão (actual Sri Lanka) entre 1860 e 1880, que acabou por substituir as suas plantações de cafeeiro por chá (Waller, 1985).

A partir de África a ferrugem chegou a Ásia e às Ilhas do Pacífico, atingindo o continente Americano em 1970 (Waller, 1985). Actualmente esta é a principal doença que ataca o cafeeiro Arábica, encontrando-se disseminada por quase todos os países produtores deste café. No Brasil estas perdas podem atingir os 30%, caso não sejam tomadas medidas de controlo adequadas. Na Índia, se não forem aplicadas as mesmas medidas, as perdas de produção podem chegar aos 70%, devido à presença de condições climáticas favoráveis ao desenvolvimento da doença (Prakash *et al.*, 2004). Estas perdas devem-se à diminuição da capacidade fotossintética das folhas infectadas que muitas vezes caem prematuramente, o que vai enfraquecendo o cafeeiro, levando ao decréscimo da sua capacidade produtiva (Waller, 1985).

### **2.2. Classificação sistemática**

A ferrugem alaranjada pertence ao género *Hemileia*, descrito pela primeira vez por Berkeley & Broome, em 1869. Actualmente a ferrugem alaranjada é classificada da seguinte forma (CABI Database, 2010):

Reino: *Fungi*

Filo: *Basidiomycota*

Classe: *Pucciniales*

Ordem: *Pucciniales*

Família: *Incertae sedis*

Género: *Hemileia*

Espécie: *Hemileia vastatrix*

### 2.3. Ciclo de vida

No ciclo biológico da *Hemileia vastatrix* Berk. e Br. conhecem-se apenas três tipos de esporos: uredósporos, teleutósporos e basidiósporos (figura 6).

Os uredósporos são dicarióticos e constituem a fase assexuada do ciclo de vida da ferrugem, sendo estes os responsáveis pela infecção e propagação da doença. Os teleutósporos, tal como os uredósporos, formam-se nos soros uredospóricos e o seu aparecimento parece estar associado a épocas do ano mais secas. Após meiose, os teleutósporos originam basidiósporos (monocarióticos) que constituem a fase sexuada do ciclo biológico deste fungo. Os basidiósporos apresentam capacidade germinativa mas não infectam as folhas do cafeeiro e não se conhecem quaisquer outros hospedeiros para estes esporos (Rodrigues Jr. *et al.*, 1980).

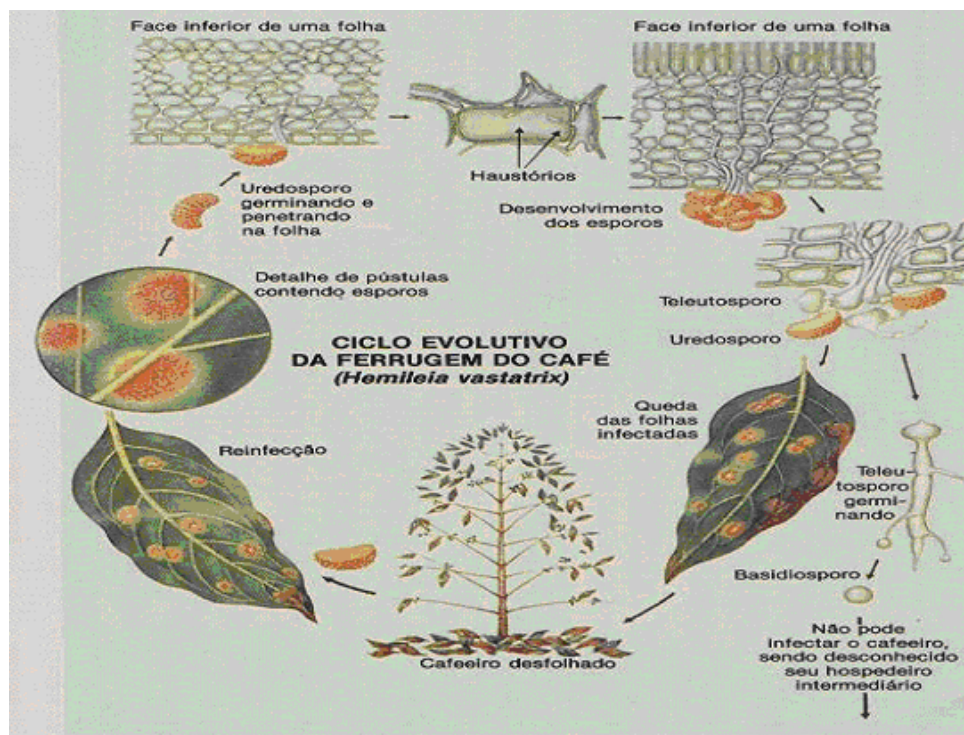


Figura 6 – Representação do ciclo de vida da *Hemileia vastatrix*  
(<http://www.uesb.br/professor/arminio/fitopatologia/imagens/ciclo.gif>)

### 2.4. Processo de infecção

A germinação dos uredósporos só acontece em presença de água no estado líquido e com temperaturas entre 15 e 30 °C, sendo a temperatura ótima de 24 °C (Nutman *et al.*, 1963). É na página inferior das folhas do cafeeiro que, em presença de condições favoráveis, os uredósporos germinam formando tubos germinativos, na extremidade dos quais se forma um apressório sobre o estoma. Depois da formação do apressório, o fungo



emite uma hifa que entra pelo estoma (hifa de penetração) e cresce para a câmara subestomática, ramificando-se em duas hifas laterais mais grossas, cuja forma lembra uma âncora (fase de âncora). Em cada uma destas hifas formam-se as células-mãe do haustório, na extremidade das quais se formam hifas intracelulares, os haustórios, que penetram nas células subsidiárias. Esta fase ocorre normalmente dois a três dias após a inoculação (Rijo & Rodrigues Jr., 1978).

Em variedades susceptíveis o crescimento do fungo continua, podendo atingir o parênquima em paliçada três a cinco dias após inoculação. Ao fim de nove dias o micélio já se encontra bem estabelecido no mesófilo, observando-se inúmeros haustórios. Cerca do vigésimo dia depois da inoculação observa-se uma grande densidade micelial junto à zona de penetração e desse micélio origina-se um soro uredospórico que sai como em *bouquet* pelo estoma. Em variedades resistentes o crescimento do fungo é reduzido, podendo cessar em qualquer fase do processo de infecção, em geral após a formação de 2 a 3 haustórios, nunca ultrapassando a segunda ou terceira camada do parênquima lacunoso (Rijo & Rodrigues Jr., 1978).

## **2.5. Meios de combate**

O controlo da ferrugem alaranjada pode ser conseguido recorrendo à luta química, nomeadamente através da aplicação de fungicidas cúpricos, como medida preventiva (Rodrigues Jr. *et al.*, 1975). No entanto este meio de combate é desvantajoso tanto a nível económico como ambiental. Assim, o desenvolvimento de variedades resistentes às raças conhecidas de *H. vastatrix* é uma opção mais eficaz, ecológica e economicamente viável de combater esta doença, tendo-se tornado uma prioridade para os centros de investigação de café (Prakash *et al.*, 2004).

## **3. Considerações gerais sobre as interacções planta – agente patogénico**

Geralmente as plantas possuem capacidade de resistir à maioria dos agentes patogénicos, sendo a situação de doença uma excepção. Para isso as plantas desenvolveram uma série de elaborados mecanismos de defesa que podem ser classificados como constitutivos ou induzidos após infecção. Simultaneamente os agentes patogénicos vão também desenvolvendo estratégias para ultrapassar os referidos mecanismos de defesa das plantas (Staskawicz, 2001).

Os mecanismos de defesa constitutivos englobam barreiras físicas e/ou químicas. As barreiras físicas envolvem propriedades da superfície da planta tais como a espessura da cutícula, forma e localização dos estomas, presença de ceras e tricomas, etc. (Singh &

Singh, 2005). As barreiras químicas incluem compostos com actividade anti-microbiana, como compostos fenólicos, terpenóides e alcalóides (Walters, 2010).

Os mecanismos de defesa induzidos baseiam-se na capacidade que a planta possui de reconhecer um agente patogénico potencialmente invasor e activar uma rede de transmissão de sinal que vai desencadear um conjunto complexo de respostas de defesa (Glazebrook, 2005). A capacidade de reconhecimento e velocidade com que a planta é capaz de responder à invasão por um agente patogénico determina o sucesso da sua resistência. Na resistência específica à raça do agente patogénico, o reconhecimento envolve a detecção por parte da planta de moléculas produzidas ou presentes no agente patogénico. Estas moléculas designam-se efectores e são produtos dos genes *avr* do agente patogénico, sendo reconhecidos pelos produtos dos genes *R* da planta hospedeira (Stergiopoulos & deWit, 2009), de acordo com a teoria gene-a-gene de Flor (1942).

Existem vários mecanismos de defesa induzidos, como a reacção de hipersensibilidade (HR), produção de formas reactivas de oxigénio (ROS), alterações estruturais ao nível das paredes celulares (deposição de calose e lenhina) e síntese de proteínas relacionadas com a patogenicidade (PRP). A HR, morte rápida das células do hospedeiro no local da infecção, é uma das respostas mais comuns de resistência nas interacções gene-a-gene, sendo considerada uma forma de morte celular programada. A HR tem um papel importante nas interacções com agentes patogénicos biotróficos, como é o caso da ferrugem, que necessitam de células vivas para sobreviverem (Glazebrook, 2005). Este mecanismo de defesa encontra-se associado a várias respostas fisiológicas, nomeadamente, o aumento da actividade de diversas enzimas como as peroxidases (POD), lipoxigenases (LOX), quitinases, glucanases e enzimas da via fenilpropanóide, como a fenilalanina amoníaco liase (PAL) e a acumulação de compostos fenólicos (Kuč, 1997).

### **3.1. Compostos fenólicos envolvidos na defesa das plantas - Ácidos clorogénicos**

Os compostos fenólicos são metabolitos secundários que se encontram distribuídos um pouco por todo o reino vegetal. Parte destes compostos encontram-se naturalmente presentes na planta, fazendo parte das suas defesas constitutivas (Nicholson & Hammerschmidt, 1992). Outros são produzidos em resposta ao stress oxidativo, seja este de origem biótica ou abiótica (Mondolot *et al.*, 2006).

Os CGA fazem parte da fracção fenólica, sendo produtos da via fenilpropanóide (Lepelley *et al.*, 2007). No anexo 1 é apresentada uma representação esquemática desta via metabólica. O 5-CQA é o mais comum entre os monoésteres, sendo considerado uma forma de armazenamento de ácido cinâmico, e aparentemente um intermediário na via metabólica da lenhina, através da acção da enzima POD (Farah & Donangelo, 2006). A deposição de

lenhina nas paredes das células infectadas do hospedeiro funciona como uma resposta de defesa, isolando o agente patogénico na zona de infecção (Nicholson & Hammerschmidt, 1992). Nas plantas os CGA e outros compostos fenólicos encontram-se armazenados nos vacúolos das células das raízes, caules, folhas, flores e frutos (Attitalla, 2004), participando numa série de funções biológicas, como na resistência a pragas e doenças (como insectos, fungos, vírus e bactérias), resposta à seca e protecção contra a radiação solar (Mondolot *et al.*, 2006).

Têm sido realizados vários estudos sobre o envolvimento dos compostos fenólicos na resistência de diversas plantas a agentes patogénicos. González *et al.* (2006) demonstraram a ocorrência de uma acumulação de compostos fenólicos, nas células do local de infecção, 24 horas após inoculação de folhas de *Arabidopsis thaliana* com esporos de *Botrytis cynerea*.

Estudos realizados com tabaco transgénico, onde a enzima PAL foi reprimida, e consequentemente tinham baixos níveis de CGA, as folhas desenvolveram um maior número de lesões após a infecção pelo fungo *Cercospora nicotianae* (Maher *et al.*, 1994). Plantas de tabaco e algodão com super-expressão de PAL produzem elevadas quantidades de 3-CQA, exibindo uma redução marcada da sua susceptibilidade a fungos patogénicos (Korkina, 2007).

O trabalho realizado por Petkovsek *et al.* (2003), acerca do papel dos ácidos clorogénicos na resistência de macieiras contra *Venturia enaequalis*, revelou a presença de maior teor em ácidos clorogénicos nas folhas das plantas resistentes inoculadas com este fungo.

Os ácidos clorogénicos, e outros compostos fenólicos, encontram-se também envolvidos na resistência das plantas a pragas, como já foi referido anteriormente. Interações entre insectos herbívoros e plantas têm sido alvo de vários estudos que revelaram a acção tóxica dos ácidos clorogénicos presentes nas plantas contra o ataque destes insectos (Leiss *et al.*, 2009; McMullen *et al.*, 2009; Bi *et al.*, 1997).

### **3.2. Interação cafeeiro-ferrugem alaranjada (respostas de defesa)**

Os estudos realizados no CIFC permitiram reconhecer que a teoria gene-a-gene de Flor (1942) se aplicava à interação cafeeiro-ferrugem. Com base nesta teoria foram identificados no cafeeiro 9 genes de resistência ( $S_H1$  a  $S_H9$ ) e na ferrugem os correspondentes genes de virulência ( $v_1$  a  $v_9$ ) (Noronha-Wagner & Bettencourt, 1967). Os genes  $S_H1$  a  $S_H5$  são provenientes de *C. arabica*, exceptuando o gene  $S_H3$  que foi identificado em *C. liberica*, os restantes ( $S_H6$  a  $S_H9$ ) só foram encontrados em derivados do “Híbrido de Timor” (*C. arabica* x *C. canephora*), o que significa que provavelmente vêm de

*C. canephora* (Bettencourt & Rodrigues Jr., 1988; Rodrigues Jr. *et al.*, 1975). Actualmente estão caracterizadas cerca de 45 raças fisiológicas de ferrugem, isoladas a partir de um grande número de amostras colhidas em 38 diferentes regiões cafeeicultoras (Várzea & Marques, 2005; Várzea *et al.*, 2002; Bettencourt & Rodrigues Jr., 1988; Rodrigues Jr. *et al.*, 1975; D'Oliveira & Rodrigues Jr., 1961; D'Oliveira, 1954-57). Estas raças distinguem-se pelo tipo de reacção que desenvolvem em relação a 18 cafeeiros diferenciadores (D'Oliveira, 1954-57). De igual modo, a classificação dos genótipos de cafeeiro em 40 grupos fisiológicos (designados por letras ou números) foi feita com base no tipo de reacção que expressam em relação às diferentes raças fisiológicas de *H. vastatrix* (Bettencourt, 1981; Rodrigues Jr. *et al.*, 1975). A reacção mais comum de resistência (R – interacção incompatível) é a pontuação clorótica com tumefacção (*flt*) e a de susceptibilidade (S – interacção compatível) grandes pústulas uredospóricas (figura 7). No entanto também existem reacções intermédias, designadas por moderadamente resistente e moderadamente susceptível (D'Oliveira, 1954-57).

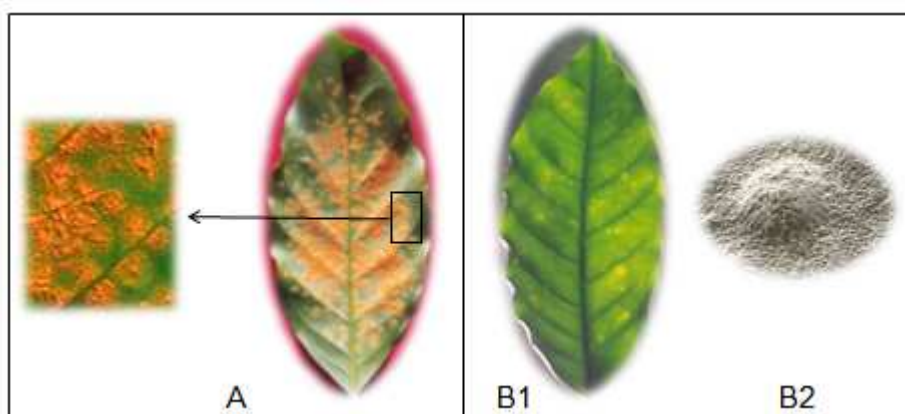


Figura 7 - Síntomas de susceptibilidade (A - pústulas uredospóricas) e de resistência (B1 - pontuações cloróticas e B2 - tumefacção) de *C. arabica* à *H. vastatrix*

A primeira resposta de resistência do cafeeiro observada citologicamente é a HR, detectada pela autofluorescência e/ou acastanhamento das células, devido à acumulação e oxidação de compostos fenólicos (Silva *et al.*, 2002). A morte celular inicia-se normalmente nas células-guarda do estoma por onde ocorreu a penetração do fungo, propaga-se às células subsidiárias e do mesófilo invadidas e por fim às células não invadidas da epiderme e do mesófilo, adjacentes ao local de infecção. A HR no cafeeiro está também associada ao encapsulamento dos haustórios com calose e celulose o que vai restringir o fornecimento de nutrientes à ferrugem, limitando assim o seu crescimento (Silva *et al.* 2002, Rijo & Vasconcelos, 1984). O rápido aumento de actividade de enzimas oxidativas como as

superóxido dismutases (SOD), LOX, POD, assim como a PAL e as PRP (quitinases e glucanases) tem também sido associado à expressão de resistência do cafeeiro à ferrugem (Guerra-Guimarães *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2008; Guerra-Guimarães *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2002; Guzzo & Martins, 1996; Rojas *et al.*, 1993; Maxemiuc-Naccache *et al.*, 1992). Em algumas interações incompatíveis foi detectado um segundo aumento de actividade da PAL e da POD mais tarde no processo de infecção, que pode estar relacionado com a acumulação de compostos fenólicos e lenhificação das paredes celulares das células hospedeiras do local de infecção (Silva *et al.* 2008, 2002). Foram já identificados diversos genes do cafeeiro que se expressam diferencialmente durante a resposta de resistência à ferrugem, e que estão envolvidos nos processos de reconhecimento, sinalização e defesa (Diniz *et al.*, 2010; Ramiro, 2009; Petitot *et al.*, 2008; Ganesh *et al.*, 2006; Fernandez *et al.*, 2004). Em diferentes interações incompatíveis foi detectado um ligeiro aumento da expressão do gene da PAL nas etapas iniciais do processo de infecção (Diniz *et al.*, 2010; Ramiro, 2009).

Assim, com o objectivo de tentar esclarecer se os ácidos clorogénicos estão envolvidos na resposta de resistência do cafeeiro à ferrugem, em particular a acumulação de compostos fenólicos no local de infecção, foi feito o seu estudo em folhas de cafeeiro sãs e inoculadas durante as etapas iniciais do processo de infecção.

#### **4. Métodos usados na análise de ácidos clorogénicos**

Os principais métodos de análise de ácidos clorogénicos são a espectrofotometria e métodos separativos como a cromatografia em fase gasosa (GC), cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e electroforese capilar. Dentro destes métodos os mais utilizados são a HPLC acoplada ou não à espectrometria de massa (HPLC-MS). A HPLC é um método analítico que permite separar uma amostra nos seus componentes individuais e quantificá-los, sendo útil na análise de amostras complexas. A HPLC-MS permite também a identificação desses componentes (De Maria & Moreira, 2004).

##### **4.1. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)**

Na análise de ácidos clorogénicos por HPLC utilizam-se normalmente colunas com suporte de fase reversa que permitem uma melhor separação destes compostos (De Maria & Moreira, 2004). O detector mais utilizado na análise destes ácidos é o detector de fotodíodos que mede a absorção a comprimentos de onda característicos de diferentes famílias de compostos presentes nas amostras (Scott, 1994). Os eluentes mais utilizados na análise de ácidos clorogénicos em extractos de semente e folha de cafeeiro, são misturas de ácido fosfórico ou ácido fórmico e ácido acético, com solventes orgânicos como o

acetoneitrilo e o metanol (Clifford *et al.*, 2008; Stalmach *et al.*, 2006; Clifford *et al.*, 2003; Bertrand *et al.*, 2003; Ky *et al.*, 1997).

#### **4.2. Espectrometria de Massa (MS)**

A MS, como já foi referido, é uma técnica que permite a identificação e quantificação de compostos numa amostra complexa. Esta técnica é muito usada acoplada à cromatografia, nomeadamente HPLC e GC.

A identificação de compostos é realizada com base na detecção do ião molecular e correspondentes fragmentos. Numa fase inicial do processo é necessário ionizar os compostos presentes na amostra. Esta operação é realizada numa fonte de ionização, que pode ser de diferentes tipos. Actualmente muitos dos equipamentos de HPLC-MS utilizam fontes que operam à pressão atmosférica, como a fonte de ESI (electrospray) e APCI (ionização à pressão atmosférica). Após formação dos iões estes são analisados e detectados (Chapman, 1993).

Existem vários analisadores de massa, nomeadamente, analisadores de sector magnético, do tipo quadrupolo e armadilha de iões. O analisador separa os iões de acordo com a sua razão massa/carga ( $m/z$ ). Dado que a grande maioria desses iões são monocarregados, a razão  $m/z$  é geralmente igual à massa do ião.

Os equipamentos do tipo triplo quadrupolo são analisadores robustos, de fácil construção e de elevada sensibilidade. Neste equipamento cada quadrupolo é constituído por quatro cilindros metálicos dispostos paralelamente (figura 8). Os iões produzidos na fonte de ionização passam entre os quatro cilindros (analisador) atingido o detector localizado na extremidade oposta. Os cilindros posicionados opostamente encontram-se ligados a uma fonte de corrente eléctrica (um par ao lado positivo e outro ao lado negativo) e a um gerador de radiofrequência. A variação do potencial fornecido pelo gerador de radiofrequência permite que iões de determinada  $m/z$  adquiram uma trajectória estável ao longo do quadrupolo, atingindo o detector. Os outros iões são neutralizados por colisão com os cilindros ou escapam da região central do quadrupolo, não chegando ao detector (Mendham *et al.*, 2002).

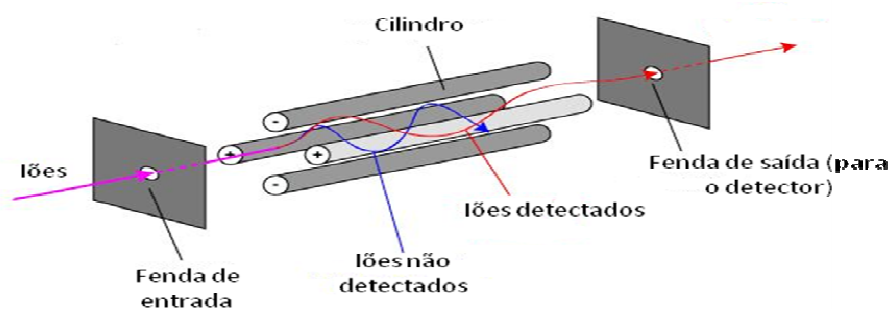


Figura 8 – Esquema do quadrupolo ([www.espectrometriademassas.com.br](http://www.espectrometriademassas.com.br))

Os analisadores de massa triplo quadrupolo são muito úteis no estudo dos diferentes fragmentos de um ião. Estes analisadores são constituídos por dois quadrupolos independentes separados por uma célula de colisão. Assim é possível seleccionar no primeiro quadrupolo as  $m/z$  dos iões precursores pretendidos e no segundo as  $m/z$  dos iões fragmento formados na célula de colisão (Chapman, 1993).

## 5. Parte Experimental

### 5.1. Material e Métodos

#### 5.1.1. Material Biológico

##### Cafeeiros

Neste estudo utilizaram-se cafeeiros *C. arabica* da variedade S4 Agaro, originários da Etiópia, pertencentes ao grupo fisiológico J, com dois genes de resistência  $S_H4,5$ . Estas plantas foram propagadas em estufas no CIFC, com uma temperatura média anual de 24 °C, em vasos contendo uma mistura de terra vegetal, turfa e areia na proporção de 4:1:1 (v/v/v).

##### Ferrugem alaranjada

Foram utilizados uredósporos frescos de dois isolados de ferrugem *Hemileia vastatrix* Berk. & Br., referidos no quadro 1.

Quadro 1 – Raças fisiológicas, origem e genes de virulência dos isolados de *H. vastatrix* utilizados

Isolados	Raça Fisiológica	Origem	Genes de virulência
1065	II	Brasil	$V_5$
178a	XIV	Índia	$V_{2,3,4,5}$

### 5.1.2. Inoculação dos cafeeiros

As inoculações foram realizadas em folhas jovens dos referidos cafeeiros, ainda em crescimento ou próximas do seu tamanho definitivo, de acordo com a técnica utilizada no CIFC (Branquinho D'Oliveira, 1954-57).

Os uredósporos foram colocados na página inferior das folhas com um escalpelo e espalhadas com um pincel. De seguida, pulverizaram-se as folhas inoculadas e todo o cafeeiro com água. Durante 24 horas os cafeeiros inoculados foram mantidos em câmara húmida e escura. Após esse período as plantas foram transferidas para a estufa.

Para facilitar os horários de colheita das folhas foram realizadas duas inoculações para cada um dos ensaios (uma de manhã, *am*, e outra à tarde, *pm*) de modo a obter amostras com 0, 12, 15, 17, 20, 24, 30, 36, 42, 48 e 72 h após a inoculação (quadro 2).

Quadro 2 – Tempos de colheita para as inoculações *am* e *pm*

	Inoculação <i>am</i>	Inoculação <i>pm</i>
Tempos de colheita (h)	0, 20, 24, 30, 48, 72	12, 15, 17, 24, 36, 42

A variedade S4 Agaro estabelece uma interacção incompatível com o isolado 1065 (resistência – R) e uma interacção compatível com o isolado 178a (susceptibilidade – S). Como controlo (C) foram utilizadas folhas sãs mantidas nas mesmas condições que as inoculadas.

### 5.1.3. Reagentes e preparação de soluções

#### Reagentes

Neste trabalho utilizaram-se reagentes, como acetato de zinco *p.a.* (da Panreac Química SAU, com um grau de pureza  $\geq 99,5\%$ ), hexacianoferrato II de potássio *p.a.* (da Merck, com um grau de pureza  $\geq 99,5\%$ ), etanol *p.a.* (da Panreac Química SAU, com um grau de pureza  $\geq 99,5\%$ ), metanol *p.a.* (da Fluka, com uma grau e pureza  $\geq 99,8\%$ ) e padrões como o 3-CQA, cafeína, ácido cafeico, catequina, ácido ferúlico e ácido *p*-cumárico. O grau de pureza mínimo destes padrões é de 99% para o ácido ferúlico e cafeína, 98% para o ácido *p*-cumárico e catequina, 97% para o ácido cafeico e 95% para o 3-CQA. Todos os padrões foram fornecidos pela Sigma Aldrich, excepto a cafeína que foi adquirida à BDH Biochemicals

Nas análises cromatográficas usaram-se os seguintes solventes: acetonitrilo (HPLC-*gradient grade*, da Panreac Química SAU, com um grau de pureza mínimo de 99,9%), ácido acético (da Merck, com um grau de pureza  $\geq 99\%$ ), ácido fórmico *p.a.* (da Panreac Química



SAU, com um grau de pureza  $\geq 98\%$ ) e ácido fosfórico *p.a.* (da Panreac Química SAU, com um grau de pureza  $\geq 85\%$ ).

A água ultra-pura utilizada neste trabalho foi obtida pelo equipamento Milli-Q Q-Gard® 1 fornecido pela Millipore. A água assim purificada apresenta um TOC (carbono orgânico total) inferior ou igual a 5 ppb e uma resistividade de 18,2 M $\Omega$ .cm, a 25 °C.

### **Preparação do reagente de Carrez**

Este reagente é composto por duas soluções. A solução I foi preparada adicionando 10,95 g de acetato de zinco a 3 ml de ácido acético num balão de 50 ml e completando o seu volume com água ultra-pura. A solução II foi preparada dissolvendo 5,3 g de hexacianoferrato II de potássio em 50 ml água ultra-pura.

### **Preparação das soluções padrão**

Preparou-se uma solução-mãe, dissolvendo 0,0101 g de ácido clorogénico (3-CQA), em 10 ml de metanol 40% (v/v). A partir da solução-mãe foram preparadas 10 soluções, por diluição com metanol 40% (v/v), com concentrações de 1, 5, 10, 20, 50, 100, 150, 200, 300 e 500 ppm. Estas soluções foram mantidas a -18 °C até serem analisadas por HPLC e foram preparadas para a elaboração das curvas de calibração.

Prepararam-se também soluções padrão de cafeína, ácido cafeico, catequina, ácido ferúlico e ácido *p*-cumárico, que foram utilizadas para efectuar sobrecargas nas amostras de folhas de cafeeiro, com o objectivo de identificar estes compostos.

A solução de ácido cafeico, com 5000 ppm, foi preparada dissolvendo 0,0500 g em 10 ml de etanol. A solução de cafeína (1000 ppm) foi obtida por dissolução de 0,0050 g em 5 ml de água ultra-pura e a de catequina, com a mesma concentração, foi preparada de forma idêntica usando-se metanol 50% (v/v), em vez de água, como solvente. A solução de ácido ferúlico (10000 ppm) foi obtida dissolvendo 0,0500 g em 5 ml de etanol. Preparou-se a solução de ácido *p*-cumárico (1000 ppm) por dissolução de 0,0050 g em 5 ml metanol.

## **5.1.4. Equipamento**

### **Balanças**

Para a pesagem das folhas de cafeeiro, acetato de zinco e hexacianoferrato II de potássio (usados na preparação do reagente de Carrez) usou-se uma balança Mettler PE 2000, fornecida pela Soquímica, e para a pesagem dos padrões uma balança Analytic AC 210 P, da Sartorius Mechatronics S.A..

### **Centrífuga**

Utilizou-se uma centrífuga Avanti® J-26 XPI, da Beckman Coulter.

### **Equipamento de Agitação**

Utilizou-se o equipamento AK 15 da empresa PACI – Material Científico e Industrial, S.A..

### **Equipamento HPLC-DAD e condições de análise**

A análise das amostras foi executada num equipamento HPLC da marca Thermo Finnigan (modelo Surveyor) equipado com amostrador automático, bomba, detector de fotodíodos (DAD). Foi ainda usado um detector electroquímico (ED) da Dionex (modelo ED40), com eléctrodo de carbono vítreo, ligado à saída do DAD. A aquisição de dados e controlo das diferentes funções do equipamento foram realizados com o software Chromquest para o detector de díodos e com o software Unicam 4880 para o detector electroquímico.

Para esta análise foi utilizada uma coluna RP-18 (5 µm) 250 × 4 mm Lichrocart® (Merck) e uma pré-coluna RP-18 (5 µm), em forno termostaticado a 35 °C. O volume de injeção utilizado foi de 20 µL e os solventes usados neste método de análise, com um fluxo de 700 µL/min, foram: solução de ácido fosfórico *p.a* (0,1% v/v) como eluente A e solução aquosa com 0,1% (v/v) de ácido fosfórico *p.a* e 40,0% (v/v) de acetonitrilo (HPLC-*gradient grade*) como eluente B. O gradiente de solventes utilizado ao longo desta análise encontra-se descrito no quadro 3.

Quadro 3 - Gradientes dos eluentes A e B usados no método de análise

Tempo (min)	Eluente A (%)	Eluente B (%)
0.10	100	0
15.00	80	20
25.00	80	20
70.00	30	70
75.00	30	70
85.00	0	100
100.00	0	100
101.00	100	0

No DAD utilizou-se um varrimento de 200 a 798 nm a uma velocidade de 1Hz e largura de banda de 5 nm, 3 canais individuais (325, 280 e 254 nm) com uma velocidade de 10Hz e uma largura de banda de 11 nm. No ED as medições foram feitas por voltametria integrada na gama de potenciais -1,0 a +1,0 V, com varrimento cíclico no tempo de 1,00 s.

Antes da análise das amostras dos extractos estudados neste trabalho, foram injectados solventes, para verificar a possível presença de contaminação da coluna. Foram também analisados os perfis de pressão durante o tempo de análise para detectar possíveis variações que possam interferir na análise.

As comparações dos perfis dos extractos foram realizadas a 325 nm, comprimento de onda ao qual a absorção é máxima para os ácidos clorogénicos (figura 9).

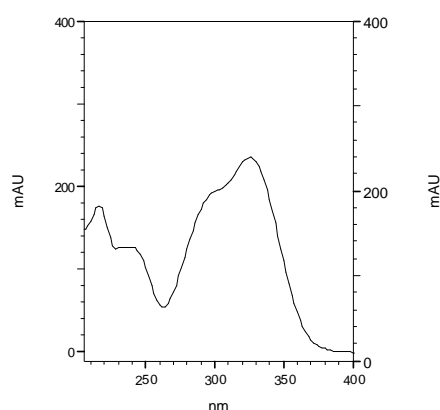


Figura 9 – Espectro de absorção do ácido clorogénico (3-CQA)

A maioria das áreas foi retirada dos cromatogramas a 325 nm. No entanto, as áreas dos picos maiores foram retiradas dos cromatogramas a 254 nm, comprimento de onda ao qual estes compostos possuem uma absorção mais baixa e, consequentemente, uma área menor. Tal procedimento deve-se ao facto de compostos em concentrações muito elevadas conduzirem à saturação do detector (a comprimentos de onda em que a absorção é elevada para esses compostos), o que leva a que o aumento das áreas dos picos de compostos nessas condições não seja proporcional ao seu aumento de concentração.

A análise quantitativa foi realizada a partir de curvas de calibração. Para a elaboração destas curvas procedeu-se à análise das soluções padrão de 3-CQA. Relacionando a área do pico do 3-CQA presente nos cromatogramas obtidos com as concentrações respectivas dessas soluções, realizaram-se duas curvas de calibração. A primeira curva foi elaborada com as áreas dos picos retiradas dos cromatogramas a 325 nm e a segunda com as áreas dos cromatogramas a 254 nm. Estas curvas, as suas equações e respectivos coeficientes de determinação são apresentados no anexo 2. A segunda curva foi elaborada para determinar as concentrações dos compostos que a 325 nm apresentaram picos saturados

(picos 12, 18 e 29) (ver cromatograma da figura 15). Para a elaboração da curva de calibração com as áreas dos cromatogramas a 254 nm, utilizaram-se as áreas e concentrações de todas as soluções padrão preparadas. Na elaboração da curva com as áreas dos cromatogramas a 325 nm foram excluídas as áreas e concentrações das duas soluções mais concentradas.

### **Equipamento HPLC-MS/MS e condições de análise**

Foi usado um sistema HPLC (Alliance, Waters 2695 Separation Module) com um detector de fotodíodos (DAD, Waters 2996) acoplado a um espectrometro de massa (Micromass Quattro Micro API) com um triplo quadrupolo (TQ) e uma fonte ESI a operar em modo negativo. A separação da amostra foi realizada numa coluna dC18 (5 µm) 150 x 2.1 mm i.d. Atlantis (Waters), utilizando uma solução de água e ácido fórmico (100:0,5, v/v) como eluente A e acetoneitrilo como eluente B. O fluxo de eluente usado foi de 200 µL/min e a temperatura da coluna mantida a 35 °C. Foi usado um gradiente de eluição de 0 a 100% de eluente B.

### **5.1.5. Preparação das amostras e metodologia de extracção**

#### **Seleccção do método de extracção**

Para a extracção dos ácidos clorogénicos das folhas de cafeeiro foram testados dois métodos, Ky *et al.* (1997) e Correia (1990), aos quais se introduziram ligeiras modificações.

Em ambos os métodos as amostras, 3 pares de folhas (cerca de 3 g pesadas após remoção da nervura central), foram congeladas em azoto líquido e reduzidas a pó num almofariz de porcelana, com azoto líquido.

No método descrito por Ky *et al.* (1997) as amostras foram colocadas em frascos de Erlenmeyer de 50 ml aos quais se adicionou 30 ml de metanol 70% (v/v), seguindo-se uma agitação a 4 °C, *overnight*. A cada frasco foi adicionado 0,5 ml de solução I e 0,5 ml de solução II do reagente de Carrez. Após 15 minutos de repouso, as amostras foram filtradas com gaze e depois com filtro Whatman nº. 1. Os extractos foram mantidos a 4 °C e na ausência de luz até serem analisados por HPLC.

Na metodologia descrita por Correia (1990) as amostras foram colocadas em tubos de centrífuga aos quais se adicionou 10 ml de metanol 40% (v/v). Os tubos foram agitados num agitador orbital a 125 rpm, a 4 °C, durante 30 minutos. Seguidamente, as amostras foram centrifugadas a 10 000 g durante 5 minutos, a 4 °C. Os sobrenadantes foram transferidos para balões de 50 ml e a extracção foi repetida mais três vezes, sendo os sobrenadantes juntos nos mesmos balões. Ao fim das quatro extracções foi adicionado a cada balão 0,5 ml de solução I e 0,5 ml de solução II do reagente de Carrez, completando-se o seu volume (50

ml) com metanol 40% (v/v). Depois de um repouso de 15 minutos, os extractos foram filtrados com gaze e depois com filtro Whatman nº. 1. Os extractos foram mantidos a 4 °C e na ausência de luz até serem analisados por HPLC.

### **Folhas, sãs e inoculadas colhidas ao longo do ensaio, e sementes**

A determinação do conteúdo em ácidos clorogénicos foi realizada em amostras de folhas de cafeeiro sãs e inoculadas (interacção compatível e incompatível), preparadas utilizando o método de Correia (1990), adaptado de acordo com o descrito acima.

Foram também preparados 3 extractos a partir de sementes das plantas de *C. arabica* S4 Agaro em estudo, seguindo-se a mesma metodologia.

### **5.1.6. Tratamento dos dados**

O software Chromquest foi utilizado na medição das áreas dos picos dos cromatogramas resultantes da análise dos extractos por HPLC, no cálculo de índices de semelhança para a comparação de espectros de absorção (cuja fórmula é apresentada no anexo 3) e no cálculo das relações sinal/ruído (S/R) necessárias à determinação dos limites de detecção e quantificação (cujos valores são apresentados no anexo 2).

O tratamento das áreas e elaboração de gráficos foram realizados utilizando o software Microsoft® Office Excel® 2007, nomeadamente na correcção das áreas, cálculo de desvios padrão associados à repetibilidade do método de extracção e análise por HPLC, elaboração das curvas de calibração e conversão das áreas em concentrações, cálculo dos limites de detecção e quantificação, análise da variação dos ácidos clorogénicos e de outros compostos ao longo do processo de infecção, quantificação dos ácidos clorogénicos nos extractos analisados e realização da ANOVA a um factor.

Os valores correspondentes às áreas dos picos detectados foram tratados recorrendo ao sistema NTSYS-pc da Exeter Software (versão 2.2.), com o qual se realizou uma análise por componentes principais.

## **5.2. Resultados e discussão**

Este trabalho foi realizado com objectivo de analisar a variação dos ácidos clorogénicos, em extractos de folhas de *C. arabica* S4 Agaro, ao longo do processo de infecção.

Para isso, foram comparados dois métodos de extracção, com o fim de se seleccionar o mais adequado para a extracção dos ácidos clorogénicos das folhas de cafeeiro. Visto que existem poucos padrões de ácidos clorogénicos disponíveis no mercado e que existem muitos trabalhos publicados nos quais se identificaram estes compostos na semente de

café, os extractos de folhas obtidos pelos dois métodos testados foram comparados com um extracto de semente de *C. arabica* S4 Agaro.

De seguida, foi avaliada a repetibilidade do método de extracção seleccionado, assim como a repetibilidade do método de análise por HPLC.

Após selecção e avaliação do método de extracção e de análise, analisaram-se os extractos de folhas, sãs e inoculadas, utilizando o método escolhido.

### 5.2.1. Análise do extracto de semente

Analizou-se o extracto de semente, cujo cromatograma é apresentado na figura 10. A sua comparação com o cromatograma obtido por Bicho (2008) permitiu identificar 8 ácidos clorogénicos (figura 10).

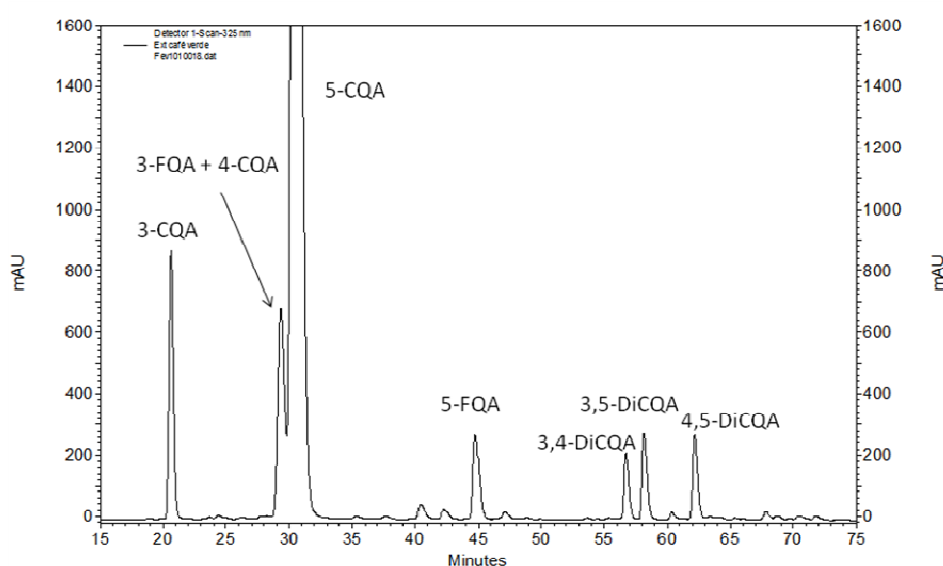


Figura 10 – Cromatograma, a 325 nm, do extracto de sementes de *Coffea arabica* S4 Agaro com a identificação dos picos referentes aos ácidos clorogénicos, por comparação com a literatura (Bicho, 2008)

### 5.2.2. Comparação dos dois métodos de extracção estudados

Para seleccionar o melhor método de extracção compararam-se os cromatogramas dos extractos de folha de cafeeiro obtidos pelos dois métodos estudados. A comparação dos perfis apresenta-se na figura 11 e mostra que estes são muito semelhantes.

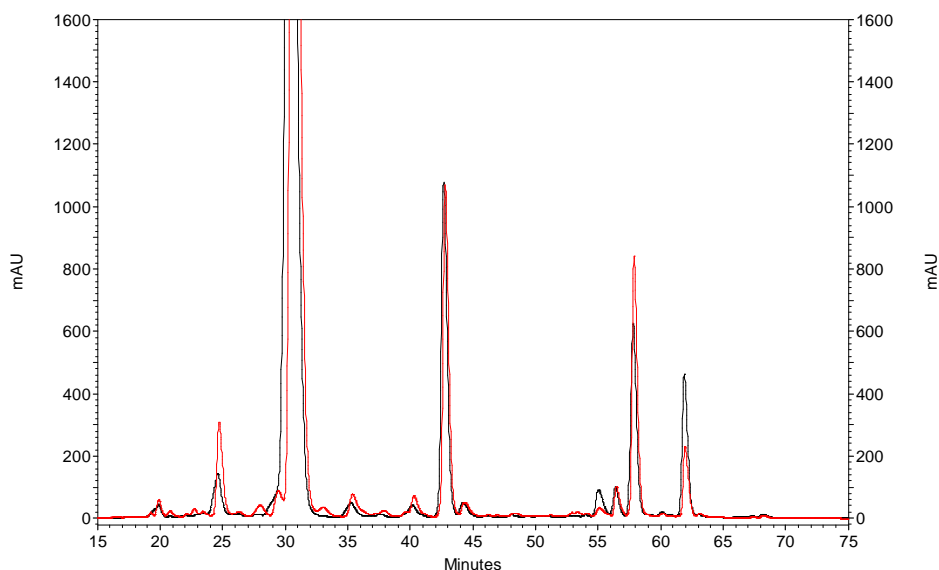


Figura 11 - Perfis cromatográficos, a 325 nm, do extracto de folha obtido pelo método de Correia (1990) (a vermelho) e Ky *et al.* (1997) (a preto)

Para tentar localizar os ácidos clorogénicos nos cromatogramas dos extractos de folha, compararam-se os seus perfis cromatográficos com o perfil obtido para o extracto de semente. Na figura 12 apresenta-se uma dessas comparações.

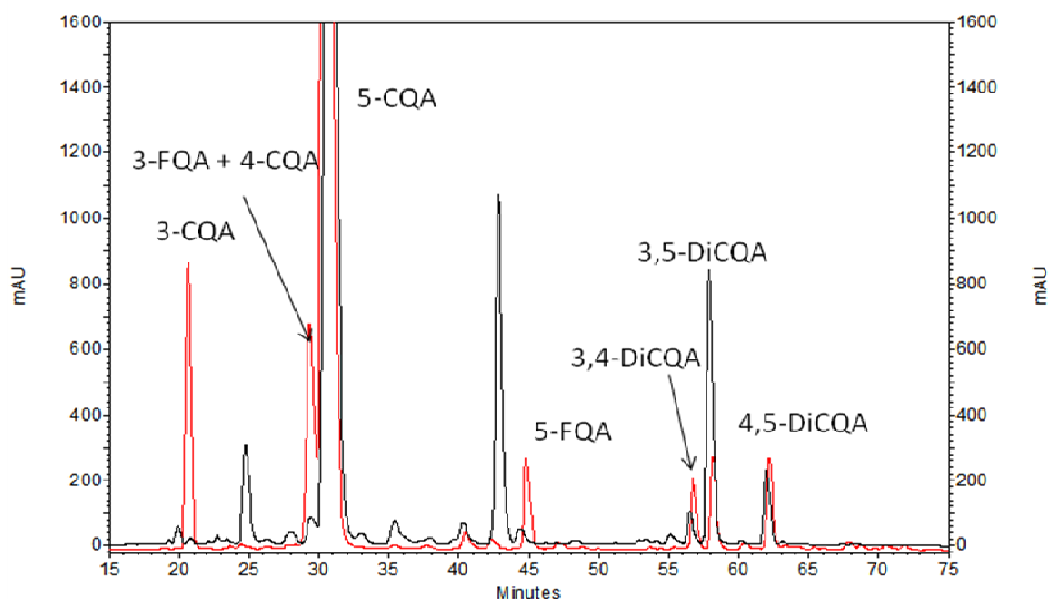


Figura 12 - Cromatogramas, a 325 nm, do extracto de semente (a vermelho) e de folha (a preto), obtido pela metodologia de Correia (1990)

Verificou-se que os picos identificados como ácidos clorogénicos no extracto de semente coincidiam com picos dos cromatogramas dos extractos de folha, obtidos pelos dois métodos.

Para averiguar se os picos coincidentes diziam respeito aos mesmos compostos, realizaram-se sobrecargas dos extractos de folha com o extracto de semente. Analisando os

perfis dos extractos de folha com e sem sobrecarga, foi possível observar aumentos na área dos referidos picos, o que permitiu confirmar uma possível identificação dos compostos.

Foram ainda comparados os espectros de absorção dos picos do extracto de semente com os dos picos coincidentes presentes nos extractos de folha, entre os 200 e 400 nm. No quadro 4 apresentam-se os índices de semelhança entre esses espectros, para os dois métodos de extracção estudados.

Quadro 4 - Índices de semelhança entre os espectros de absorção dos picos do extracto de semente e os dos picos dos extractos de folha, obtidos pelos dois métodos utilizados

Ácidos clorogénicos**	Índice de Semelhança*	
	Método Correia (1990)	Método Ky <i>et al.</i> (1997)
3-CQA	0,995	0,973
3-FQA+4-CQA	0,992	0,992
5-CQA	0,999	0,998
5-FQA	0,697	0,694
3,4-DiCQA	0,857	0,966
3,5-DiCQA	0,978	0,980
4,5-DiCQA	0,996	0,991

\*Os valores do índice de semelhança podem variar entre 0 e 1.

\*\* Identificação de acordo com a figura 12.

Assim, verificou-se que os dois métodos testados dão origem a extractos semelhantes, em termos de concentração e composição em ácidos clorogénicos. O método seleccionado para este trabalho foi o de Correia (1990), por ser um método que permite a preparação dos extractos num intervalo de tempo mais curto.

A comparação dos espectros de absorção e a análise dos respectivos índices de semelhança revelou uma grande semelhança dos espectros analisados, à excepção do espectro do pico identificado como 5-FQA, pelo facto de este apresentar um valor de IS muito diferente de um aponta para a presença, nas folhas, de um composto diferente do identificado na semente, embora ambos com o mesmo tempo de retenção. Nas figuras 13 e 14 apresenta-se, como exemplo, a comparação dos espectros dos picos correspondentes ao 3,5-DiCQA e ao 5-FQA respectivamente.



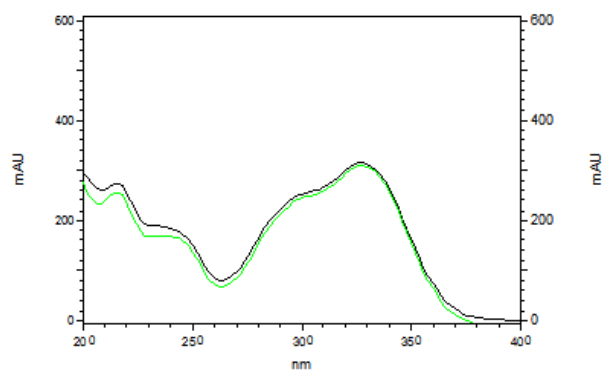


Figura 13 – Espectros de absorção (200 a 400 nm) do pico do 3,5-DiCQA presente no cromatograma do extracto de semente (a verde) e no do extracto de folha preparado com o método de Ky *et al.* (1997) (a preto) (IS=0,980)

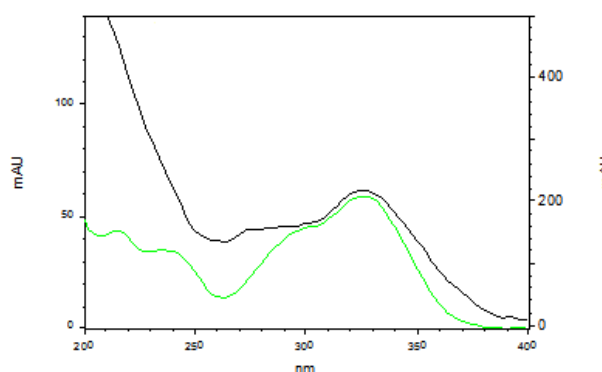


Figura 14 - Espectros de absorção (200 a 400 nm) do pico do 5-FQA presente no cromatograma do extracto de semente (a verde) e no do extracto de folha preparado com o método de Correia (1990) (a preto) (IS=0,697)

### 5.2.3. Repetibilidade dos métodos de extracção e de análise por HPLC

Após a escolha do método de extracção testou-se a repetibilidade do mesmo, assim como a repetibilidade do método de análise por HPLC. Para testar a repetibilidade do método de extracção analisaram-se três extractos preparados independentemente, e para testar a repetibilidade do método de análise por HPLC os mesmos três extractos foram analisados três vezes cada um (quadro 5).

Quadro 5 - Análise da repetibilidade do método cromatográfico e do método de extracção

Pico	Compostos	Desvio Padrão Relativo* (%)	
		RMC**	RME***
3	3-CQA	0,54	15,06
7	Ácido trihidroxicinamoiquínico, CFQA, composto NI	0,48	8,20
12	Cafeína, 3-FQA, 5-CQA, dímero CQA, composto NI	0,49	17,22
18	4-CQA, mangíferina, epicatequina, compostos NI	0,85	10,81
19	4- <i>p</i> CoQA, ácido <i>p</i> -cumárico, composto NI	0,65	8,57
27	3,4-DiCQA, CFQA, <i>p</i> CoFQA	0,81	12,37
28	3,5-DiCQA, CFQA, <i>p</i> CoFQA, DiFQA	0,80	15,32
29	4,5-DiCQA, CFQA, <i>p</i> CoFQA, DiFQA	1,33	13,81
34	<i>p</i> CoCQA composto NI	2,50	17,95
Média		1,06	12,86
Área Total****		1,95	10,51

\*Desvio padrão relativo das áreas dos picos dos cromatogramas resultantes dos extractos preparados para esta análise.

\*\*Repetibilidade do método cromatográfico.

\*\*\*Repetibilidade do método de extracção.

\*\*\*\*Refere-se à soma das áreas de todos os picos de cada cromatograma.

NI – não identificado

No que se refere à repetibilidade do método cromatográfico, os valores do desvio padrão relativo das áreas dos picos onde se identificaram os ácidos clorogénicos, que se encontram acima do limite de detecção, variaram entre 0,48 e 2,50%, enquanto que para a repetibilidade do método de extracção esses valores variaram entre 8,20 e 17,95%, valores que podem justificar uma certa variabilidade dos resultados neste trabalho. Tal variabilidade pode ter origem no próprio teor em ácidos clorogénicos das folhas utilizadas, visto que folhas em diferentes estados de desenvolvimento apresentam diferentes concentrações nestes compostos (Mondolot *et al.*, 2006). Dado que os valores dos desvios padrão relativos calculados para a repetibilidade do método cromatográfico são baixos, considera-se que este é repetível.

#### 5.2.4. Identificação dos ácidos clorogénicos e de outros compostos nos extractos de folha

Analysaram-se por HPLC os três ensaios correspondentes aos extractos de folhas sãs (controlo) e inoculadas (interacção compatível e incompatível), colhidas nos referidos tempos após a inoculação. Os cromatogramas resultantes da análise destes extractos pelo detector DAD, a 325 nm, apresentaram cerca de 40 picos (figura 15), mostrando um perfil muito semelhante entre as amostras.

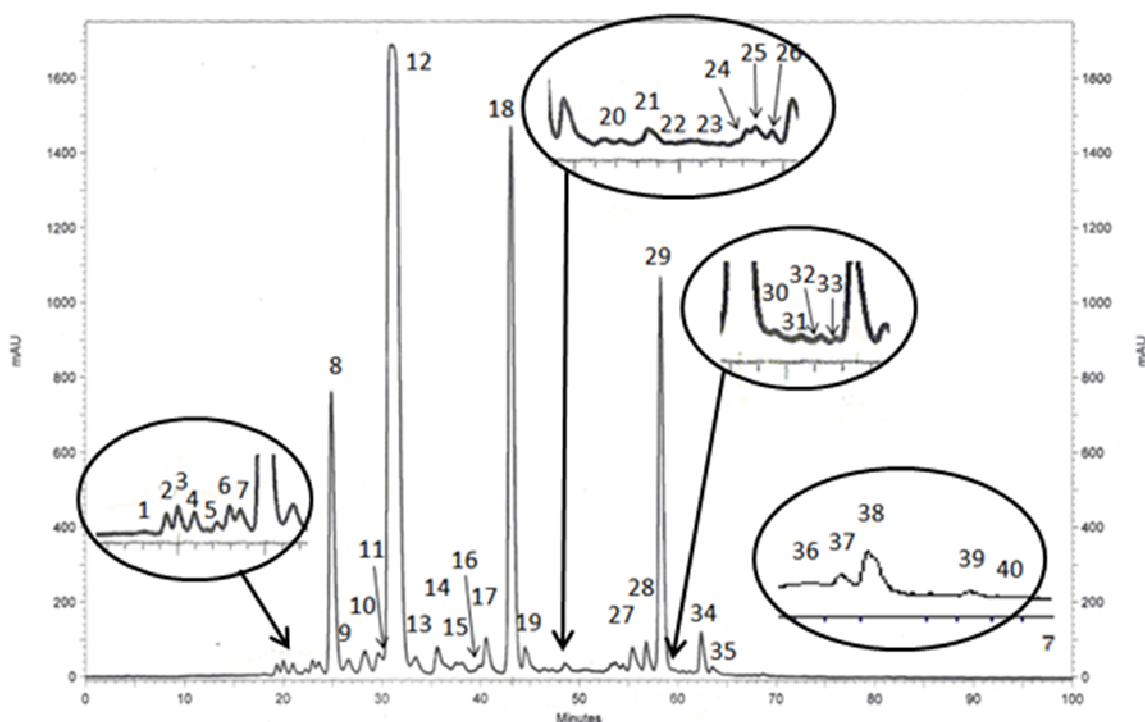


Figura 15 - Cromatograma, a 325 nm, de um dos extractos de folha com a numeração dos picos

Os cromatogramas resultantes da análise dos mesmos extractos pelo detector ED apresentaram-se, igualmente, semelhantes entre si, mas apenas com 4 picos. Na figura 16 apresenta-se um desses cromatogramas, a título de exemplo.

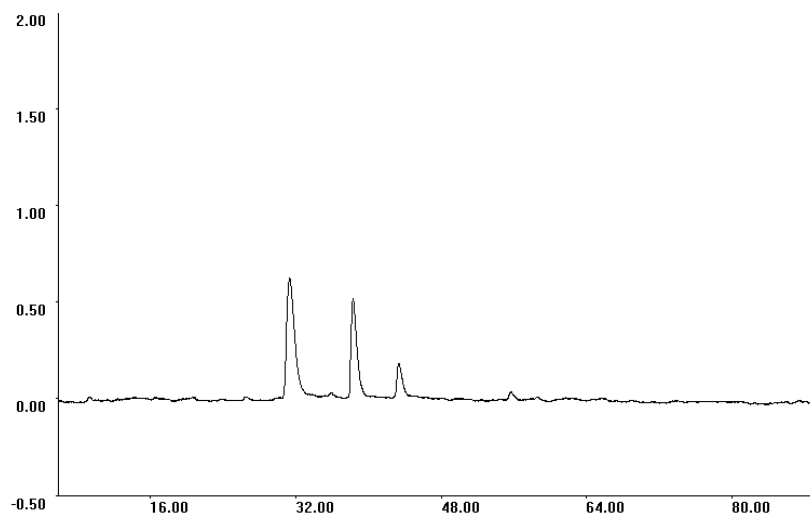


Figura 16 – Cromatograma obtido através do ED de um dos extractos de folha

Os cromatogramas resultantes da análise pelo detector electroquímico dão informação acerca da presença e quantidade de compostos com possível actividade antioxidante. Dado que os tempos de retenção dos cromatogramas do ED são semelhantes aos do DAD (no máximo, 6 s de diferença) pode verificar-se que os picos que possuem compostos com maior actividade anti-oxidante são os picos 12, 15, 19 e 27. A actividade anti-oxidante

detectada nestes picos é, muito provavelmente, consequência da presença de 5-CQA no pico 12, procianidina B1 no pico 15 e de 3,4-DiCQA no pico 27 (vidé identificação dos compostos no quadro 6). Tal afirmação baseia-se no estudo realizado por Stalmach *et al.* (2006), no qual foi verificada a actividade anti-oxidante dos CQA e DiCQA, e no estudo de Muselík *et al.* (2007) no qual se verificou essa mesma actividade nas procianidinas. No entanto, foram identificados, nos extractos de folha, outros compostos (vidé quadro 6) que são referidos na bibliografia como possuindo capacidade anti-oxidante, tais como o 3-CQA, 4-CQA, 3,5-DiCQA e 4,5-DiCQA (Stalmach *et al.*, 2006), catequina e epicatequina (Muselík *et al.*, 2007) e mangíferina (Stoilova *et al.*, 2008), e que não foram detectados pelo ED. Isto sugere que alguns destes compostos, como o 3-CQA cuja área do pico é pequena, se apresentam numa concentração muito reduzida nos extractos (abaixo do limite de detecção do ED), ou que estes compostos perderam a sua actividade anti-oxidante.

A análise por LC-MS/MS permitiu identificar alguns dos ácidos clorogénicos já referidos por outros autores como estando presentes em café. Esta identificação foi realizada comparando os  $m/z$  dos iões precursores e dos iões fragmento com os encontrados na literatura. Compararam-se também os tempos de retenção e analisaram-se os espectros de absorção dos picos referentes a estes compostos.

Foi também feita a identificação de outros compostos com sobrecarga das amostras com padrões e com a informação fornecida pela análise por HPLC-MS/MS, bem como através da informação recolhida na literatura. No quadro 6 apresentam-se os tempos de retenção,  $m/z$  dos iões precursor e fragmento e comprimentos de onda máximos dos compostos identificados, assim como de alguns não identificados. No anexo 4 apresenta-se um quadro com os tempos de retenção e comprimentos de onda máximos dos 40 picos e também os  $m/z$  de alguns deles.

Quadro 6 - Tempo de retenção,  $m/z$ , comprimento de onda máximo e identificação de compostos nos cromatogramas dos extractos de folha de cafeeiro

Pico	$t_R^*$	$\lambda_{\text{máx}}^{**}$ (nm)	$m/z^{***}$ dos iões		Identificação de compostos****
			Precursor	Fragmento	
3	19.49	<b>325</b> , 290	353	191	3-CQA <sup>[1,2,10]</sup>
7	22.85	<b>230</b> , 280, 310	369	<b>191</b> , 177	Ácido trihidroxicinamoilquínico <sup>[8]</sup>
			529		CFQA <sup>[1]</sup>
			475		N.I.
9	24.82	290	289	<b>245</b> , 205, 203, 179	Catequina <sup>[4,7]</sup>
12	29.91	<b>325</b> , 300			Cafeína
			641	<b>405</b> , 449	N.I.
			367	<b>149</b> , 173, 193, 191	3-FQA <sup>[1,2,10]</sup>
			353	191	5-CQA <sup>[1,2,10]</sup>
			707	<b>353</b> , 191	Dímero de CQA <sup>[9]</sup>
13	31.67	<b>320</b> , 280			Ácido cafeico
15	36.63	<b>230</b> , 270	641	<b>405</b> , 403, 325, 287	N.I.
			577	<b>425</b> , 289, 287	Procianidina B1 <sup>[4]</sup>
			421	<b>301</b> , 331, 421, 403	Mangiferina <sup>[6]</sup>
			579	289	N.I.
18	41.92	<b>230</b> , 255, 320, 365	711	421	N.I.
			289	<b>245</b> , 203, 179, 227	Epicatequina <sup>[4,7]</sup>
			353	191	4-CQA <sup>[1,2,10]</sup>
			775	<b>421</b> , 353, 679	N.I.
			773		N.I.
19	43.48	<b>215</b> , 270, 330			Ácido <i>p</i> -cumárico
			421		N.I.
			337	<b>173</b> , 163	5- <i>p</i> CoQA <sup>[1,2,3,10]</sup>
20	45.96	280	284	<b>205</b> , 222	N.I.
			491		N.I.
			773		N.I.
			<b>367</b>	<b>191</b> , 173	5-FQA <sup>[1,2]</sup>
21	47.78	280	337	<b>191</b> , 163	4- <i>p</i> CoQA <sup>[1,2,3,10]</sup>
22	49.32	280			Ácido ferúlico
24	51.40	280, 325	773		N.I.
			367	<b>191</b> , 179, 193	4-FQA <sup>[1,2,10]</sup>
27	53.97	<b>325</b> , 285	529		CFQA <sup>[1,3]</sup>
		<b>325</b> , 285	515	<b>353</b> , 335, 173, 179, 191	3,4-DiCQA <sup>[1,5]</sup>
		<b>280</b> , 325	513		<i>p</i> CoFQA <sup>[1,3]</sup>
28	55.68	<b>325</b> , 290	515	<b>353</b> , 191, 179	3,5-DiCQA <sup>[1,5]</sup>
			513		<i>p</i> CoFQA <sup>[1,3]</sup>
			529		CFQA <sup>[1,3]</sup>

			543		DiFQA <sup>[1,3]</sup>
			515	<b>353</b> , 173, 179	4,5-DiCQA <sup>[1,5]</sup>
29	57.11	<b>325</b> , 280	529		CFQA <sup>[1,3]</sup>
			543		DiFQA <sup>[1,3]</sup>
			513		pCoFQA <sup>[1,3]</sup>
34	61.28	<b>325</b> , 295	499		pCoCQA <sup>[1,3]</sup>
38	67.33	<b>240</b> , <b>325</b>	499	<b>337</b> , 163, 353, 173	pCoCQA <sup>[1,3]</sup>
39	69.49	240	499	<b>337</b> , 335, 319, 173	3C,4-pCoQA <sup>[1,3]</sup>
40	70.66	<b>240</b> , 320	499	163	pCoCQA <sup>[1,3]</sup>
			543		DiFQA <sup>[1,3]</sup>

\*Tempo de retenção (cf. Fig. 13)

\*\*Comprimento de onda de absorção máxima (valores a negrito representam  $\lambda_{\text{máx}}$  predominante)

\*\*\*Razão entre a massa e a carga (valores a negrito representam a  $m/z$  predominante)

\*\*\*\*Entre parentesis rectos indicam-se as referências bibliográficas que apoiaram a identificação:

<sup>1</sup>Clifford *et al.*, 2006a; <sup>2</sup>Clifford *et al.*, 2003; <sup>3</sup>Clifford *et al.*, 2006b; <sup>4</sup>Tomás-Barberán *et al.*, 2001; <sup>5</sup>Clifford *et al.*, 2005; <sup>6</sup>Schieber *et al.*, 2003; <sup>7</sup>Stintzing *et al.*, 2004; <sup>8</sup>Fang *et al.* (2002), <sup>9</sup>Clé *et al.*, 2008; <sup>10</sup>Clifford *et al.*, 2006c.

N.I. – composto não identificado

Os CQA foram identificados pela detecção da  $m/z$  353, característica do ião precursor destes ácidos, e da  $m/z$  191 característica de um dos iões fragmento. Visto que não se obtiveram quaisquer outras  $m/z$  de iões fragmento destes ácidos, a identificação do 3-CQA, 4-CQA e 5-CQA foi realizada de acordo com a ordem de eluição observada na literatura (Alonso-Salses *et al.*, 2009; Clifford *et al.*, 2006a, 2006b, 2006c, 2003; Bicchi *et al.*, 1995).

Os FQA foram identificados pela  $m/z$  367 (ião precursor). O 3-FQA foi identificado pelas  $m/z$  149, 193 e 191, o 4-FQA pelas  $m/z$  191 e 193 e o 5-FQA pelas  $m/z$  191 e 173, que são características dos iões fragmento destes ácidos. A ordem de eluição indicada na bibliografia também foi tida em conta para esta identificação (Alonso-Salses *et al.*, 2009; Clifford *et al.*, 2006a, 2006b, 2006c; Bicchi *et al.*, 1995).

Os DiCQA foram identificados com base na  $m/z$  515, característica do ião precursor destes compostos. O 3,4-DiCQA foi identificado pelas  $m/z$  353, 335, 173, 179 e 191. O 3,5-DiCQA e o 4,5-DiCQA foram identificados com base na sua ordem de eluição dado que as  $m/z$  dos iões fragmento obtidos são características dos três isómeros (Alonso-Salses *et al.*, 2009; Clifford *et al.*, 2006a, 2005).

O 5-pCoQA (pico 19) e o 4-pCoQA (pico 21) foram identificados pela  $m/z$  337 (ião precursor). Embora as  $m/z$  dos iões fragmento obtidas para estes compostos sugiram a identificação do 4-pCoQA no pico 19 e o 5-pCoQA no pico 21, tal identificação não se encontra de acordo com a ordem de eluição observada em trabalhos publicados (Clifford *et al.*, 2006a, 2006b, 2006c, 2003) nem com a ordem de eluição dos restantes monoésteres identificados neste trabalho, em que os isómeros 4- eluem depois dos 5-. A identificação do

3-*p*CoQA nestes picos foi excluída dado que as *m/z* dos iões fragmento não são as mesmas que as obtidas para este composto nos referidos trabalhos publicados.

As *m/z* 513, 529 e 543, características dos iões precursores dos *p*CoFQA, CFQA e DiFQA, respectivamente (Clifford *et al.*, 2006a, 2006b), não originaram quaisquer iões fragmento, e por isso não foi possível identificar os diferentes isómeros destes ácidos.

Identificou-se também o 3C,4-*p*CoQA através da *m/z* 499 (característica do ião precursor dos *p*CoCQA) e das *m/z* 337, 335, 319 e 173 (iões fragmento). A *m/z* 499 relativa ao pico 34 não originou quaisquer iões fragmento, a relativa ao pico 38 originou iões fragmento com *m/z* 337, 163, 353 e 173 e a relativa ao pico 40 originou um ião fragmento com *m/z* 163. Comparando estes *m/z* com os encontrados na literatura não foi possível a identificação destes isómeros (Clifford *et al.*, 2006a, 2006b).

O composto com o ião precursor com *m/z* 369 e iões fragmento 191 e 177 foi identificado como ácido trihidroxicinamoilquínico (Fang *et al.*, 2002). Identificou-se também um dímero de CQA com base nas *m/z* 707 (ião precursor), 353 e 191 (iões fragmento) (Clé *et al.*, 2008).

A catequina e a epicatequina foram identificadas com base na *m/z* 289 característica dos seus iões precursores, na *m/z* dos seus iões fragmento (245, 205, 203 e 179 para a catequina e 245, 203, 179 e 227 para a epicatequina) e na sua ordem de eluição (Tomás-Barberán *et al.*, 2001; Stintzing *et al.*, 2004).

A procianidina B1 foi identificada com base na *m/z* 577 (ião precursor) e nas *m/z* 425, 289 e 287 (iões fragmento) (Tomás-Barberán *et al.*, 2001).

A identificação da mangíferina foi realizada com base nas *m/z* 421 (ião precursor) e 301, 331 e 403 (iões fragmento) (Schieber *et al.*, 2003). Embora este composto se encontre associado à manga também já foi encontrado em folhas de cafeeiro (Talamond *et al.*, 2008).

O ácido cafeico, a cafeína, o ácido ferúlico e o ácido *p*-cumárico foram identificados através da análise por HPLC de um extracto com sobrecarga de soluções destes compostos.

As *m/z* dos iões precursor e fragmento encontradas na literatura para os ácidos clorogénicos e para a catequina, epicatequina, procianidina B1 e mangíferina são apresentados no anexo 5.

### **5.2.5. Quantificação dos ácidos clorogénicos na interacção *C. arabica* – *H. vastatrix***

O teor em ácidos clorogénicos dos extractos de folhas R, S e C foi determinado com o objectivo de se detectarem diferenças nas concentrações destes compostos em função da interacção compatível e incompatível, e controlo.

Analisando o quadro 7 verifica-se que são as amostras C que possuem um maior conteúdo total em CGA e as amostras S são as que apresentam menor. No entanto, a aplicação da ANOVA a um factor permitiu verificar, que os valores dos conteúdos médios totais não são significativamente diferentes entre si. Aplicando a mesma análise estatística verificou-se que a maioria dos valores das concentrações dos compostos presentes nos picos onde se identificaram os ácidos clorogénicos, nas amostras C, R e S, também não se apresentaram significativamente diferentes entre si. As excepções são os compostos presentes nos picos 7, 18 e 19 cujos valores das suas concentrações nas amostras C são significativamente maiores que os das amostras S.

Independentemente da amostra, o pico 12 foi o que se apresentou mais concentrado devido à co-eluição de vários compostos neste pico e, nomeadamente, devido à presença do 5-CQA, referido na literatura como o ácido clorogénico mais abundante no café (Mondolot *et al.*, 2006; Farah & Donangelo, 2006). Embora a cafeína também co-elua neste pico, contribui pouco para tal concentração, dado que possui uma absorção muito reduzida ao comprimento de onda usado para a quantificação dos compostos presentes neste pico (254 nm).

Dado que os DiCQA são referidos na literatura como uma das principais famílias de ácidos clorogénicos presentes na semente e que os compostos que co-eluem nos picos onde se identificaram os DiCQA são referidos como estando presentes em pouca quantidade (Campa *et al.*, 2005), pode considerar-se que as concentrações calculadas para os compostos presentes nos picos 27, 28 e 29 corresponderão essencialmente às concentrações de 3,4-DiCQA, 3,5-DiCQA e 4,5-DiCQA, respectivamente. Destes, o 4,5-DiCQA é o que está presente em maior concentração.

Quadro 7- Concentração média dos ácidos clorogénicos (e de outros compostos que co-eluem nos picos destes ácidos) identificados nas amostras C (controlo), R (resistente) e S (susceptível)

Pico	Compostos	Concentração* (ppm)		
		C	R	S
3	3-CQA	1,20±0,35	1,15±0,17	1,09±0,18
7	Ácido trihidroxicinamoiquínico, CFQA, composto NI	0,58±0,19	0,58±0,30	0,47±0,22
12	Cafeína, 3-FQA, 5-CQA, dímero CQA, composto NI	237,82±53,85	225,27±53,14	218,66±45,72
18	4-CQA, mangíferia, epicatequina, compostos NI	185,21±29,34	180,98±37,97	165,26±34,18
19	4- <i>p</i> CoQA, ácido <i>p</i> -cumárico, composto NI	4,36±1,2	4,08±0,95	3,68±0,91
20	5-FQA, compostos NI	< LD	< LD	< LD
21	5- <i>p</i> CoQA	< LD	< LD	< LD
24	4-FQA, composto NI	< LD	< LD	< LD
27	3,4-DiCQA, CFQA, <i>p</i> CoFQA	2,03±0,88	1,92±0,86	2,01±0,78
28	3,5-DiCQA, CFQA, <i>p</i> CoFQA, DiFQA	3,40±0,78	3,36±0,65	3,24±0,65
29	4,5-DiCQA, CFQA, <i>p</i> CoFQA, DiFQA	35,03±9,89	37,64±11,20	36,59±9,24



34	pCoCQA, composto NI	5,15±2,34	5,16±2,18	5,07±1,77
38	pCoCQA	< LD	< LD	< LD
39	3C,4-pCoQA	< LD	< LD	< LD
40	pCoCQA, DiFQA	< LD	< LD	< LD
<b>Total</b>		475,12	460,49	436,44

\*Os valores apresentados representam a média±desvio padrão das concentrações dos compostos presentes nas amostras nos três ensaios (teste F=0,005, P<0,05)  
LD=limite de detecção.

A diversidade de ácidos clorogénicos referida por Clifford *et al.* (2006b) na semente de café foi também verificada nas folhas de *C. arabica* S4 Agaro, no presente estudo.

Mondolot *et al.* (2006) estudaram o teor em CGA, em diferentes estados de desenvolvimento foliar de *C. canephora*, tendo verificado que as folhas mais jovens possuíam uma maior quantidade de CGA, em particular de DiCQA, que foi diminuindo à medida que as folhas atingiam a fase adulta. No entanto o ácido clorogénico presente em maior concentração, independentemente do seu estado de desenvolvimento foliar, foi o 5-CQA. Estes resultados estão de acordo com os obtidos neste trabalho, uma vez que ao utilizar folhas jovens (para garantir o sucesso do processo de infecção da ferrugem) obtivemos concentrações elevadas de alguns dos CGA, em particular de 5-CQA e DiCQA.

As áreas dos 40 picos presentes nos cromatogramas destes extractos (*vidé* exemplo na fig. 15) foram analisadas por ACP, tratando-se cada ensaio de forma independente. Este tipo de análise é muito útil no tratamento de resultados constituídos por um grande número de variáveis e amostras, como é o caso do presente estudo.

Esta análise permitiu detectar diferenças e semelhanças entre os extractos obtidos em cada ensaio, através de representações da distribuição das amostras num espaço bi e tridimensional.

As amostras de extractos de folhas resultantes da interacção incompatível (resistente) foram identificadas com R, com o tempo após inoculação e com o número do ensaio (1, 2 ou 3). As outras amostras foram identificadas da mesma forma, usando-se a letra C para o controlo e S para a interacção compatível (susceptível).

Após análise dos resultados a variância total acumulada nas três primeiras componentes principais foi de 38,37%, 55,44% e 65,42%, para o primeiro ensaio; 32,58%, 56,76% e 70,36% para o segundo ensaio e 38,74%, 56,18%, 65,17%, para o terceiro ensaio. As distribuições tridimensionais e bidimensionais das amostras e das variáveis nos diferentes espaços são apresentadas no anexo 6. Devido ao elevado número de amostras/variáveis tais representações tornam-se difíceis de visualizar. Assim, para facilitar a leitura dos resultados, cada ensaio foi dividido em dois grupos, *am* e *pm*, de acordo com a hora da

inoculação (*vide* 5.1.2. Inoculação dos cafeeiros). Cada grupo foi analisado individualmente para cada um dos ensaios, utilizando-se o modelo com três componentes principais.

No quadro 8 apresentam-se os valores das variâncias acumuladas nas três primeiras componentes para as amostras estudadas, os vários ensaios e grupos e no quadro 9 apresentam-se os respectivos *eigenvalues*.

Quadro 8 - Variações acumuladas nas três primeiras componentes principais (CP), pelo modelo ACP, para os 3 ensaios e grupos *am* e *pm*

	Variância acumulada (%)					
	1º Ensaio		2º Ensaio		3º Ensaio	
	Grupo <i>am</i>	Grupo <i>pm</i>	Grupo <i>am</i>	Grupo <i>pm</i>	Grupo <i>am</i>	Grupo <i>pm</i>
1ª CP	47,81	45,71	35,06	34,61	59,20	39,07
2ª CP	65,60	62,93	63,87	61,13	70,98	57,21
3ª CP	74,89	71,98	82,33	74,86	77,97	70,99

Quadro 9 – Valores de *eigenvalue* correspondentes às três primeiras componentes principais (CP), pelo modelo ACP, para os 3 ensaios e grupos *am* e *pm*

	<i>Eigenvalue</i>					
	1º Ensaio		2º Ensaio		3º Ensaio	
	Grupo <i>am</i>	Grupo <i>pm</i>	Grupo <i>am</i>	Grupo <i>pm</i>	Grupo <i>am</i>	Grupo <i>pm</i>
1ª CP	19,13	18,28	14,02	13,84	23,09	15,63
2ª CP	7,11	6,89	11,52	10,61	4,60	7,26
3ª CP	3,72	3,62	7,39	5,49	2,72	5,51

Analisando as representações bidimensionais da distribuição das amostras observou-se, no primeiro e segundo ensaios, um agrupamento generalizado das amostras em função das interações R ou S ou do controlo (C), como se pode verificar na figura 17 e no anexo 7, onde igualmente se pode observar que as amostras de extractos de folhas inoculadas (R e S) formam, conjuntamente, agrupamentos distintos das amostras de folhas sãs (C).

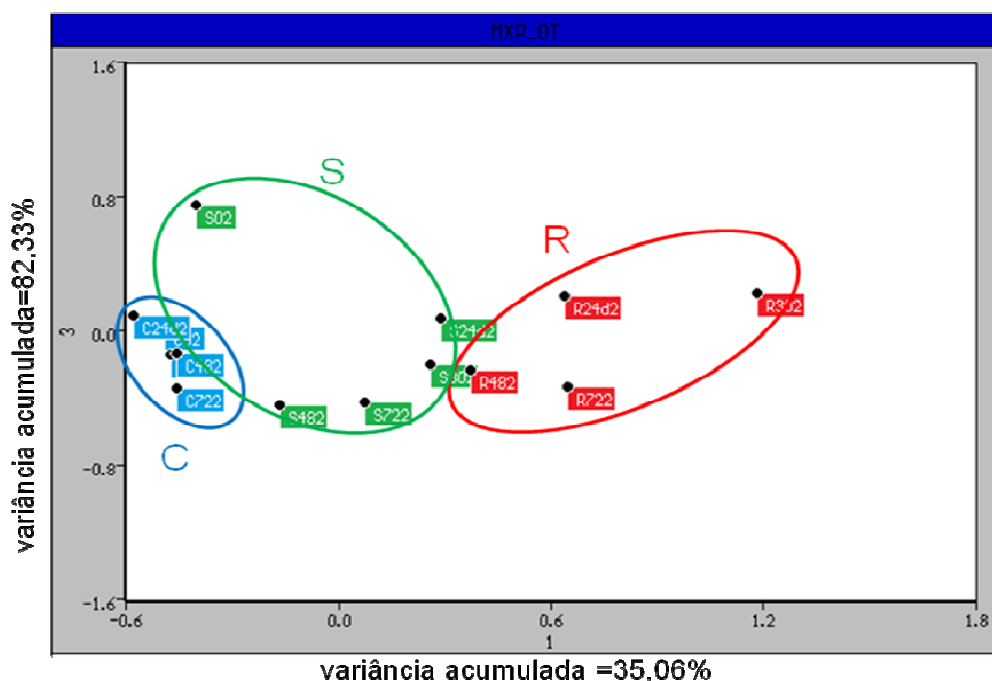


Figura 17 – Projecção das amostras C (controlo), R (resistente) e S (susceptível) do grupo *am* (0, 24, 30, 48 e 72 horas após inoculação) do segundo ensaio, no espaço definido pela primeira e terceira componentes principais

Estas distribuições agrupadas não se verificaram no terceiro ensaio, que se mostrou diferente dos outros dois e não foi, por isso, considerado.

Procedeu-se também à representação gráfica bidimensional das amostras e das variáveis, de modo a averiguar quais as variáveis (áreas dos picos cromatográficos) que contribuíram para discriminar as amostras.

A análise das representações bidimensionais da distribuição das amostras e variáveis permitiu verificar que as amostras R30 e R24 do primeiro (anexo 8) e segundo ensaios (figura 18) se encontram próximas uma da outra, o que indica que estas amostras são semelhantes. Nas mesmas figuras pode observar-se um grande número de variáveis dispostas junto das referidas amostras, o que significa que nestas amostras essas variáveis estão presentes em maior quantidade que nas restantes. Pode então concluir-se que estas amostras são mais ricas nos compostos presentes nos picos representados por essas variáveis.

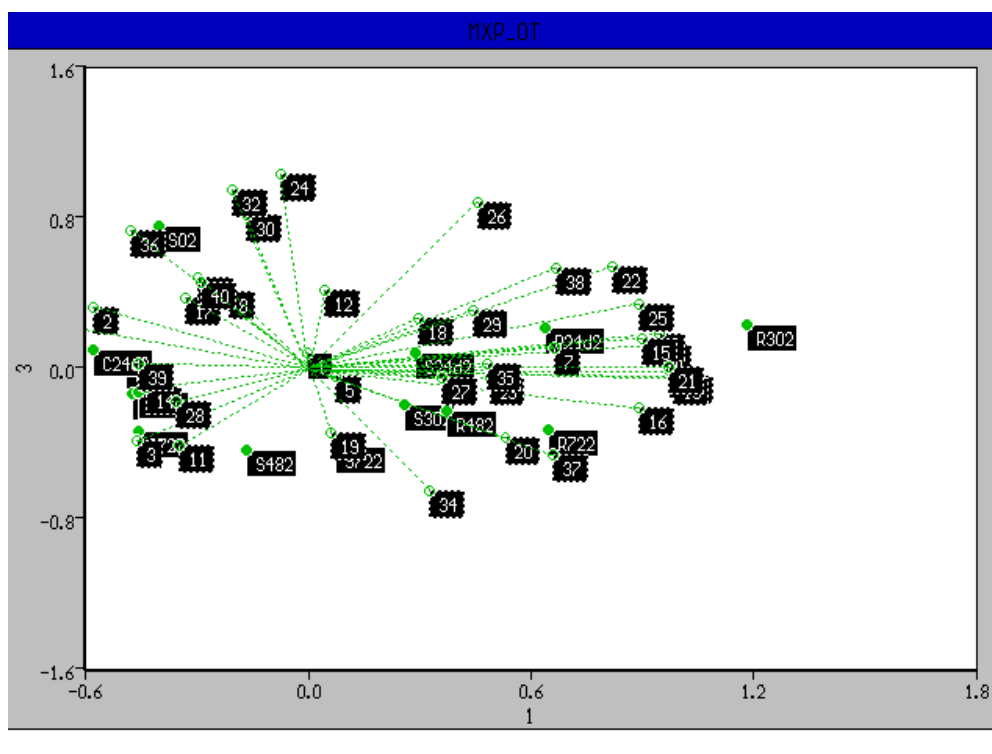


Figura 18 - Projecção das amostras e C (controlo), R (resistente) e S (susceptível) e das 40 variáveis do grupo *am* (0, 24, 30, 48 e 72 h após inoculação) do segundo ensaio, no espaço definido pela primeira e terceira componentes principais

No grupo *pm* do primeiro ensaio foram os extractos C que mostraram possuir uma maior quantidade de compostos (anexo 8). No mesmo grupo do segundo ensaio foram as amostras de extractos de folhas inoculadas (R e S) que se revelaram mais ricas (anexo 8).

A análise por ACP permitiu verificar uma grande variação dos compostos entre os ensaios e a influência na distribuição das amostras de vários picos com tamanhos pequenos e que se apresentam mal separados nos cromatogramas dos extractos. As áreas dos picos nestas condições são difíceis de calcular e por isso a sua influência na distribuição das amostras pode apresentar-se condicionada por erros de integração. Esta análise permitiu também salientar algumas semelhanças entre o primeiro e segundo ensaios, nomeadamente na distribuição agrupada das amostras C, R e S. Observou-se ainda a semelhança entre as amostras R24 e R30, cuja riqueza em vários compostos contribuiu para a sua diferenciação em relação às restantes amostras.

A variação da concentração dos extractos de folha de cafeeiro em ácidos clorogénicos foi estudada com o objectivo de detectar aumentos na sua concentração, no decorrer do processo de infecção, que indicassem o possível envolvimento destes compostos na resposta de resistência da planta. Com esse objectivo analisou-se também a variação da

concentração dos compostos cujas áreas dos picos contribuíram para a diferenciação dos extractos na ACP, ao longo do tempo do ensaio.

Observou-se um aumento significativo da concentração dos compostos presentes no pico 29 (4,5-DiCQA, CFQA, DiFQA e *p*CoFQA) e 7 (ácido trihidroxicinamoilquínico, CFQA e composto não identificado), às 30 horas após inoculação, nas amostras resistentes, o que não foi observado nas amostras susceptíveis nem nas do controlo (figuras 19 e 20) (Leitão *et al.*, 2010, vidé anexo 9).

É importante salientar que a concentração dos compostos presentes no pico 29 é muito superior à dos presentes no pico 7.

Embora no pico 29 tenham sido identificados vários ácidos clorogénicos, a maior parte da área deste pico diz, muito provavelmente, respeito ao 4,5-DiCQA, já que os restantes ácidos se apresentam em pequena concentração na semente de café, como já foi referido (Campa *et al.*, 2005).

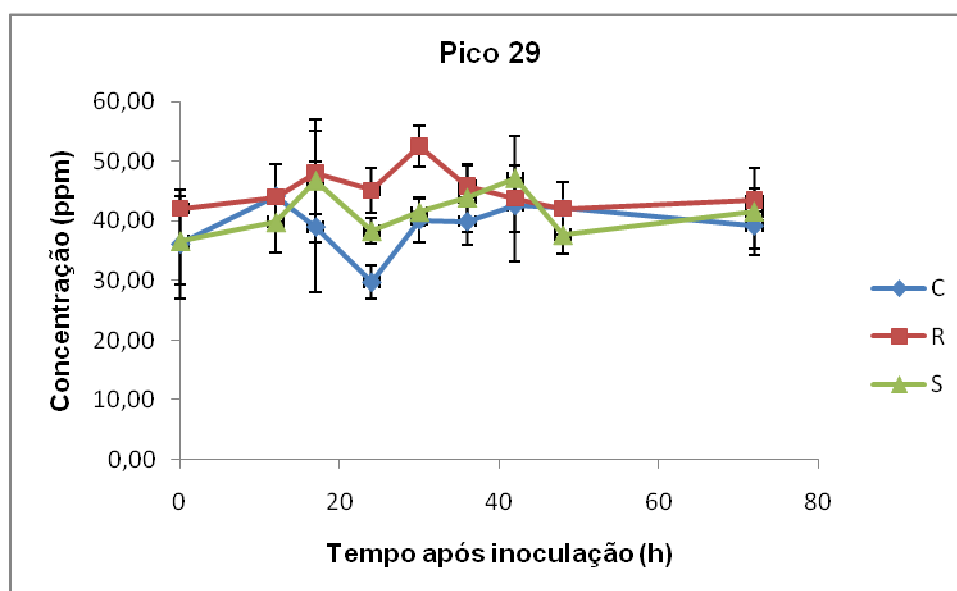


Figura 19 - Concentração dos compostos que co-eluem no pico 29 (4,5-DiCQA, CFQA, DiFQA e *p*CoFQA) nas amostras C (controlo), R (resistente) e S (susceptível), entre as 0 e 72h após inoculação (cada valor representa a média  $\pm$  o desvio padrão). Os valores obtidos às 30 h após inoculação para a amostra R foram significativamente diferentes dos valores das amostras C e S (teste F=8,94, P<0,10)

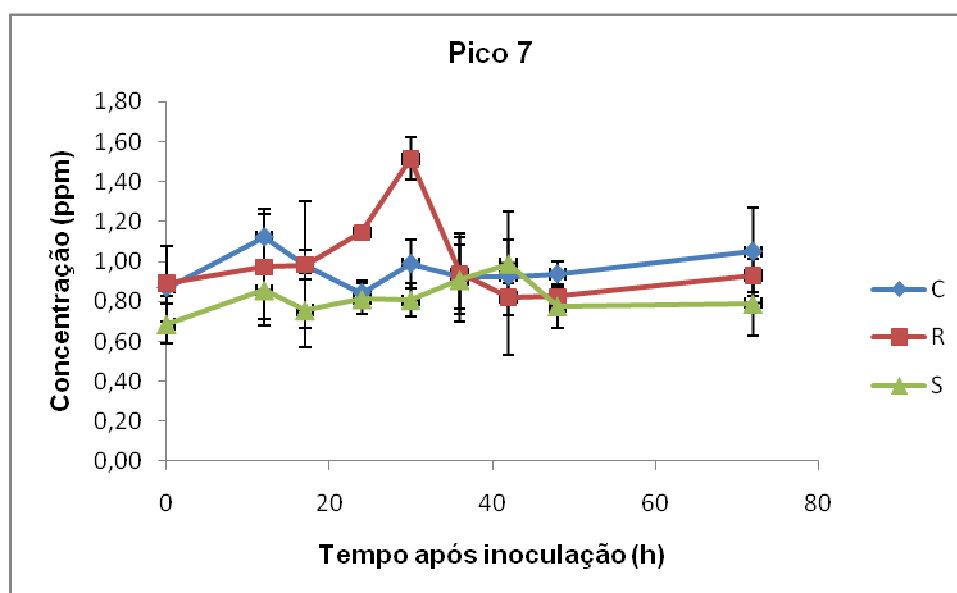


Figura 20 - Concentração dos compostos presentes no pico 7 (ácido trihidroxicinamoilquínico, CFQA e composto não identificado) dos cromatogramas das amostras C (controle), R (resistente) e S (susceptível), entre as 0 e 72h após inoculação (cada valor representa a média  $\pm$  o desvio padrão). Os valores obtidos às 30 h após inoculação para a amostra R foram significativamente diferentes dos valores das amostras C e S (teste  $F=24,45$ ,  $P<0,10$ )

Para os restantes compostos estudados, os perfis de variação obtidos ao longo do processo de infecção para as amostras R e S são semelhantes aos anteriormente referidos. No entanto, não foi possível observar diferenças relativamente às amostras controle devido à sua grande variação nestas amostras.

De acordo com Cohen *et al.* (1990), a acumulação dos compostos fenólicos antecede a lenhificação dos tecidos e pode estar associada à HR, sendo assim um dos primeiros mecanismos de defesa contra os agentes patogénicos. Provavelmente, os fenóis produzidos desempenham duas funções diferentes: como “pool” de precursores da lenhina necessários para aumentar a sua síntese, e como compostos sintetizados *de novo*, os quais podem ser fungitóxicos (Vanacker *et al.* 2000; Carver *et al.* 1998; Cahill & McComb, 1992). A resistência do cafeeiro à ferrugem é caracterizada citologicamente pela HR, detectada pela autofluorescência e/ou acastanhamento das células devido à acumulação e oxidação de compostos fenólicos no local de infecção e penetração do fungo, e pelo crescimento restrito do fungo (Silva *et al.*, 2002). Foi igualmente detectado o aumento de actividade das enzimas PAL (enzima inicial da biossíntese dos fenóis) e peroxidase (associada à HR pela oxidação de compostos fenólicos com produção de radicais livres de oxigénio e envolvida também na biossíntese da lenhina através da oxidação os álcoois hidroxicinamicos nas paredes celulares da planta) nas fases iniciais do processo de infecção (Silva *et al.* 2002, 2008). Diniz *et al.* (2010) detectaram também o aumento moderado da expressão do gene da *pal*

em interações incompatíveis. No nosso trabalho o aumento dos compostos fenólicos identificados nos picos 7 e 29 (4,5-DiCQA, CFQA, DiFQA, *p*CoFQA e ácido trihidroxicinamoilquínico) na interação incompatível no início do processo de infecção, sugerem uma possível relação entre esses compostos e a resposta de resistência do cafeeiro à ferrugem, em particular a HR. Uma vez que foram identificados vários outros compostos nas folhas de cafeeiro para os quais não se verificou relação com a defesa, é possível que alguns deles também possam estar envolvidos na resposta de resistência do cafeeiro à ferrugem.

## 6. Conclusões

O presente trabalho permitiu verificar a diversidade e abundância em ácidos clorogénicos das folhas de *C. arabica* (27 ácidos identificados) que corresponderam a cerca de 460 µg/g de folha.

Não foi observada diferença significativa no teor total de compostos detectados a 325 nm das folhas sãs e das folhas inoculadas (interacção compatível e incompatível).

O possível envolvimento dos ácidos clorogénicos na defesa do cafeeiro contra a ferrugem alaranjada só foi evidenciado para os compostos presentes no pico 7 e 29, entre os quais o 4,5-DiCQA é, provavelmente, o mais abundante. Embora apenas estes compostos tenham revelado uma possível relação com a resistência de *C. arabica* à *H. vastatrix*, não significa que outros ácidos clorogénicos não possam também estar relacionados com essa resposta. Para verificar tal relação seria necessário melhorar a repetibilidade do método de extracção, que introduziu alguma variabilidade nos resultados deste trabalho. Embora esta variabilidade se deva, muito provavelmente, sobretudo ao tipo de amostra em estudo (folhas jovens), a realização de um maior número de ensaios (inoculações) e o aumento da quantidade de folhas por amostra, poderiam não só diminuir a variabilidade, como também originar resultados mais coerentes.

Para realizar uma quantificação mais precisa destes compostos seria necessário explorar as potencialidades da MS (que neste trabalho foi usada apenas na identificação de compostos), utilizando métodos mais selectivos que permitam seleccionar apenas um composto e assim determinar a sua concentração individual.

## 7. Anexos



## Anexo 1

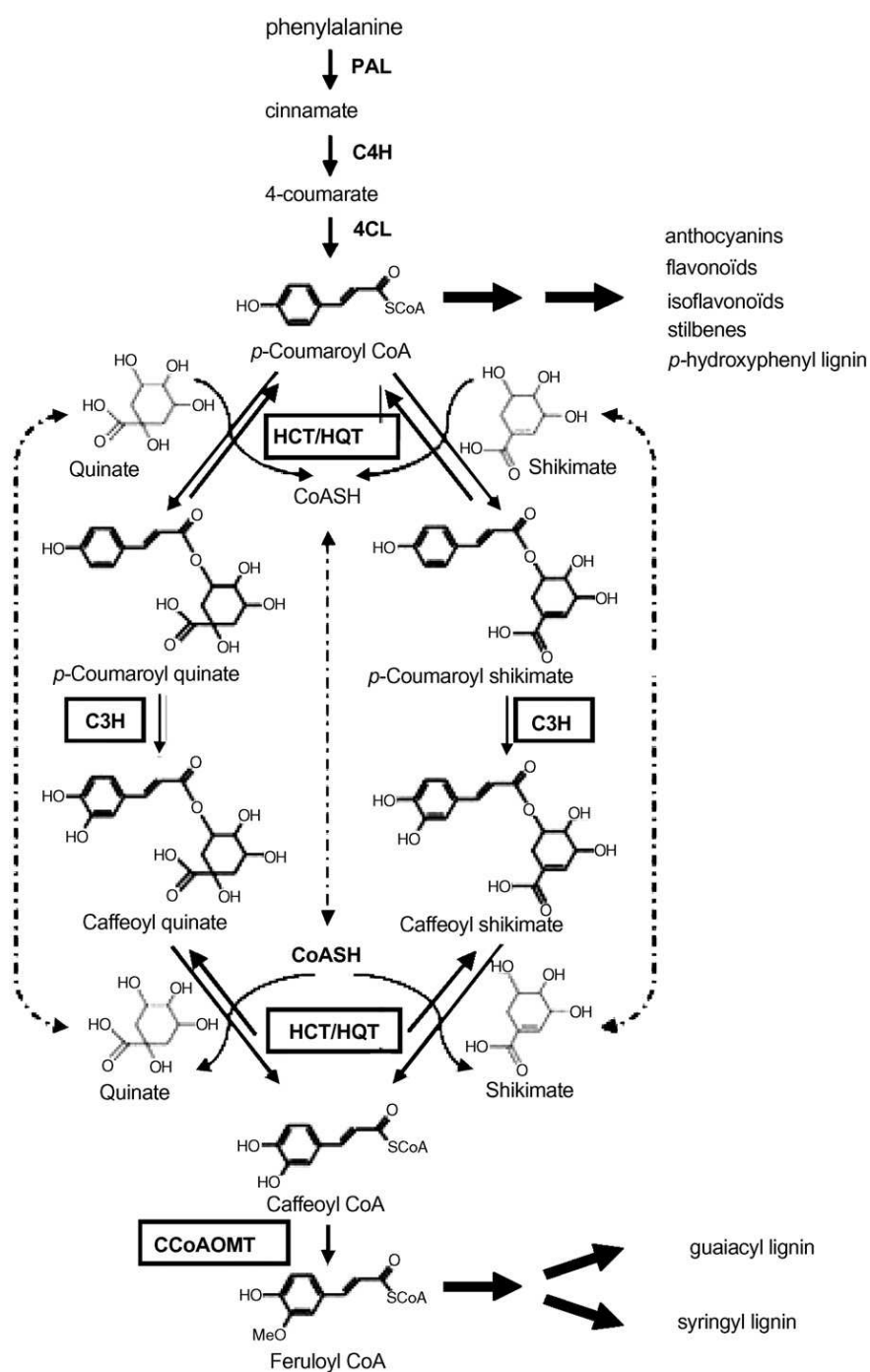
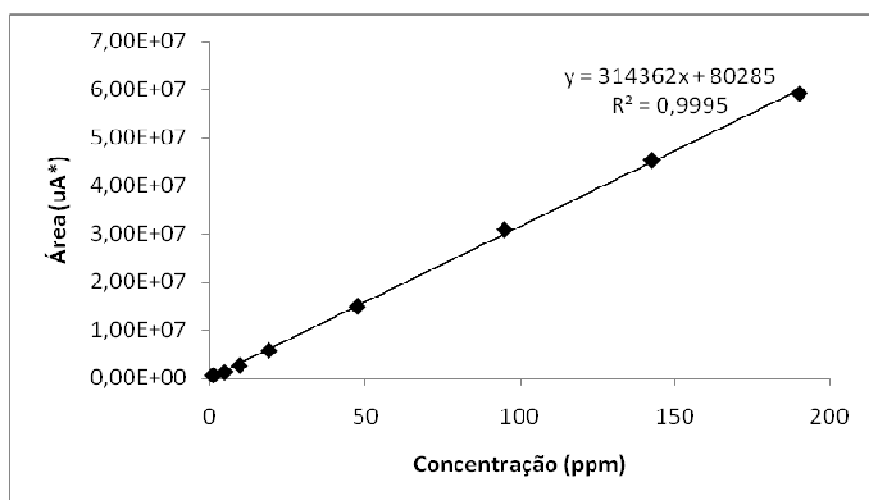


Figura 21 – Esquema da via fenilpropanóide. C4H - cinamato 4-hidrolase, 4CL - 4-hidroxicinamoil-CoA ligase, CoA - co-enzima A, HCT - hidroxicinamoil-CoA shikimato/quinato hidroxicinamoil transferase, HQT - hidroxicinamoil-CoA quinato hidroxicinamoil transferase, C3H - *p*-cumarato 3-hidrolase, CCoAOMT - cafeoil-CoA o-metiltransferase (Lepelley *et al.*, 2007)

## Anexo 2



\*Unidades de área (uA=10<sup>6</sup>UA.s)

Figura 22 – Curva de calibração obtida a partir das áreas dos cromatogramas a 325 nm das soluções padrão de 3-CQA, com a respectiva equação de regressão e coeficiente de determinação

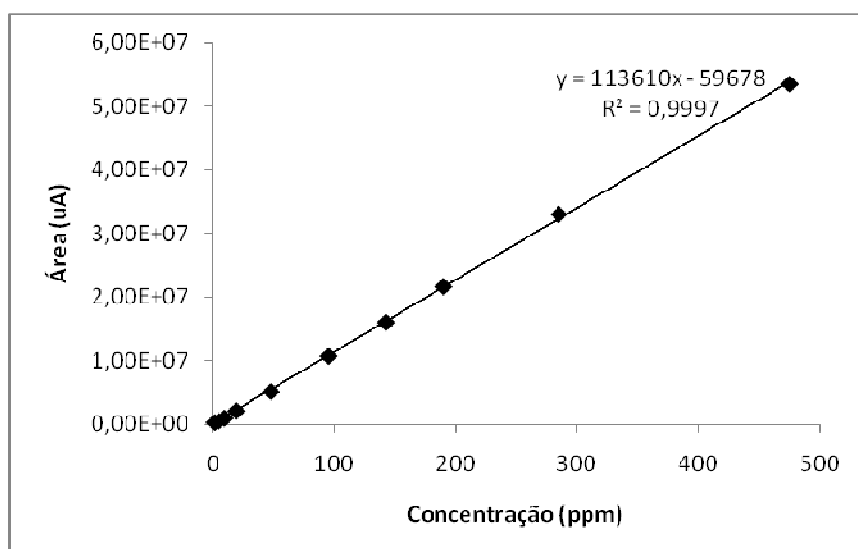


Figura 23 - Curva de calibração obtida a partir das áreas dos cromatogramas a 254 nm das soluções padrão de 3-CQA, com a respectiva equação de regressão e coeficiente de determinação

Quadro 10 – Limites de detecção e quantificação de 3-CQA para as curvas de calibração obtidas a 325 e 254 nm

		Curva de calibração (325 nm)	Curva de calibração (254 nm)
Limites* (ppm)	Deteção	0,05	0,04
	Quantificação	0,17	0,15

\*Considerou-se para o limite de detecção concentrações superiores ao triplo do valor da S/R e para o limite de quantificação valores superiores a dez vezes esse valor.

### Anexo 3

A expressão de cálculo do índice de semelhança (IS) é a seguinte:

$$IS = \frac{\sum_{i=1}^n C_i \times C'_i}{n - 1}$$

Onde:

$$C_i = \frac{S_i - M(S)}{DP(S)}$$

e

$$C'_i = \frac{S'_i - M(S')}{DP(S')}$$

S representa os valores dos comprimentos de onda (nm) de um dos espectros de absorção e S' representa os valores do outro. O número de comprimentos de onda presentes em cada espectro é representado por n.

O IS toma valores entre 0 e 1. Valores do IS que se aproximem de 1 indicam a semelhança entre dois espectros de absorção.

## Anexo 4

Quadro 11 – Tentativa de identificação dos compostos responsáveis pelos picos cromatográficos, com base nos respectivos tempos de retenção ( $t_R$ ), comprimento de onda máximo ( $\lambda_{\max}$ ) e  $m/z$

Pico	$t_R^*$	$\lambda_{\max}^{**}$ (nm)	$m/z^{***}$ dos iões		Identificação do composto****
			Precursor	Fragmento	
1	17.52	<b>230</b> , 275, 308	191		N.I.
2	18.81	<b>280</b> , 315	599	299	N.I.
			773		N.I.
			299		N.I.
3	19.49	<b>325</b> , 290	353	191	3-CQA
4	20.68	<b>200</b> , 270	343		N.I.
5	21.55	280			N.I.
6	22.24	280	369		N.I.
7	22.85	<b>230</b> , 280, 310	369	<b>191</b> , 177	Ácido trihidroxicinamoilquínico
			529		CFQA
			475		N.I.
8	23.92	290	641	<b>297</b> , 449	N.I.
			705	513	N.I.
			475	<b>293</b> , 429	N.I.
			407	<b>287</b> , 317, 245, 193	N.I.
9	24.82	290	289	<b>245</b> , 205, 203, 179	Catequina
10	26.90	<b>200</b> , 280, 310			N.I.
11	28.27	<b>325</b> , 290			N.I.
12	29.91	<b>325</b> , 300	641	405, 449	Cafeína
			367	<b>149</b> , 173, 193, 191	Composto NI
			353	191	3-FQA
			707	<b>353</b> , 191	5-CQA
13	31.67	<b>320</b> , 280			Dímero de CQA
14	34.16	<b>209</b> , <b>280</b> , 325			Ácido cafeico
15	36.63	<b>230</b> , 270	641	<b>405</b> , 403, 325, 287	N.I.
			577	425, 289, 287	Procianidina B1
16	38.64	<b>280</b> , 325			N.I.
17	39.35	<b>310</b> , 290			N.I.
18	41.92	<b>230</b> , 255, 320, 365	421	<b>301</b> , 331, 421, 403	Mangiferina
			579	289	N.I.
			711	421	N.I.
			289	<b>245</b> , 203, 179, 227	Epicatequina
			353	191	4-CQA
			775	<b>421</b> , 353, 679	N.I.
			773		N.I.

19	43.48	<b>215</b> , 270, 330	421		Ácido <i>p</i> -cumárico
			337	<b>173</b> , 163	N.I.
			284	205, 222	5- <i>p</i> CoQA
20	45.96	280	491		N.I.
			773		N.I.
			<b>367</b>	<b>191</b> , 173	5-FQA
21	47.78	280	337	<b>191</b> , 163	4- <i>p</i> CoQA
22	49.32	280			Ácido ferúlico
23	49.93	280			N.I.
24	51.40	280, 325	773		N.I.
			367	<b>191</b> , 179, 193	4-FQA
25	52.53	280, 320	671	627	N.I.
			577		N.I.
26	53.24	280, 320			N.I.
		<b>325</b> , 285	529		CFQA
27	53.97	<b>325</b> , 285	515	<b>353</b> , 335, 173, 179, 191	3,4-DiCQA
	54.28	<b>280</b> , 325	513		<i>p</i> CoFQA
			515	<b>353</b> , 191, 179	3,5-DiCQA
28	55.68	<b>325</b> , 290	513		<i>p</i> CoFQA
			529		CFQA
			543		DiFQA
			515	353, 173, 179	4,5-DiCQA
29	57.11	<b>325</b> , 280	529		CFQA
			543		DiFQA
			513		<i>p</i> CoFQA
30	58.39	<b>280</b> , 325			N.I.
31	59.25	<b>280</b> , 328			N.I.
32	60.02	<b>260</b> , 280, 325			N.I.
33	60.56	<b>220</b> , 280, 320			N.I.
34	61.28	<b>325</b> , 295	499		<i>p</i> CoCQA
35	62.26	<b>315</b> , 230	193		N.I.
36	65.32	<b>230</b> , 280, 325			N.I.
37	66.59	<b>240</b> , 320			N.I.
38	67.33	<b>240</b> , <b>325</b>	499	<b>337</b> , 163, 353, 173	<i>p</i> CoCQA
39	69.49	240	499	<b>337</b> , 335, 319, 173	3C,4- <i>p</i> CoQA
40	70.66	<b>240</b> , 320	499	163	<i>p</i> CoCQA
			543		N.I.

\*Tempo de retenção

\*\*Comprimento de onda máximo (valores a negrito representam  $\lambda_{\text{máx}}$  predominante)

\*\*\*Razão entre a massa e a carga (valores a negrito representam a  $m/z$  predominante)

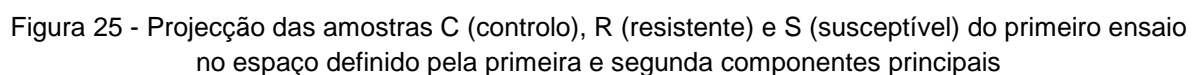
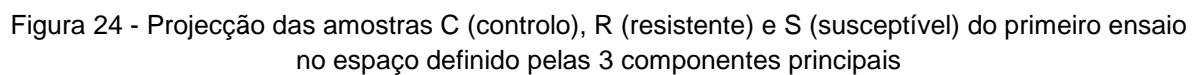
\*\*\*\*N.I. - não identificado

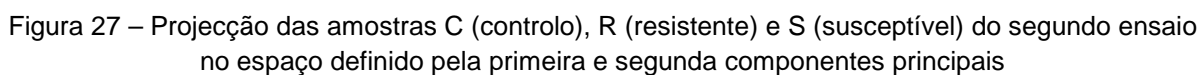
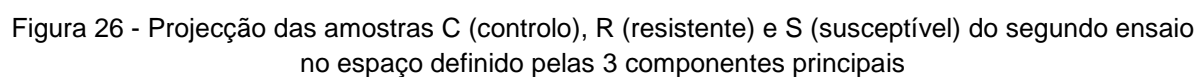
## Anexo 5

Quadro 12 - Caracterização espectrométrica dos ácidos clorogénicos e outros compostos identificados

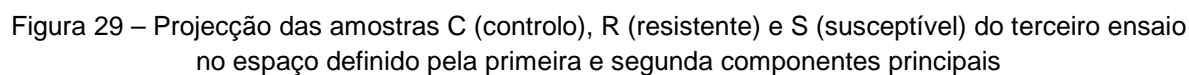
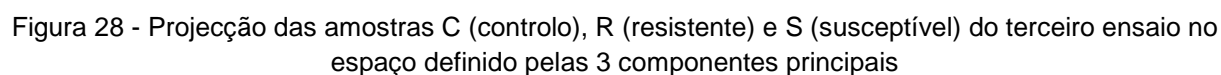
Compostos	m/z dos iões			
	Precursor	Fragmento		
	MS <sup>1</sup>	MS <sup>2</sup>	MS <sup>3</sup>	MS <sup>4</sup>
3-CQA	353	<b>191</b> , 179, 135	<b>85</b> , 127, 173	
4-CQA		<b>173</b> , 179, 191, 135	<b>93</b> , 111	
5-CQA		<b>191</b> , 179, 161	<b>127</b> , 93, 85, 173	
3- <i>p</i> CoQA	337	163	119	
4- <i>p</i> CoQA		<b>173</b> , 163	<b>93</b> , 111	
5- <i>p</i> CoQA		<b>191</b> , 163	<b>85</b> , 127, 172	
3-FQA	367	<b>193</b> , 191	<b>134</b> , 149	<b>106</b>
4-FQA		<b>173</b> , 193	<b>93</b> , 111	
5-FQA		<b>191</b> , 173	<b>85</b> , 127, 173	
3,4-DiCQA	515	<b>353</b> , 335, 173, 179, 203, 255	<b>173</b> , 179, 191, 135	<b>93</b> , 111, 172
3,5-DiCQA		<b>353</b> , <b>191</b> , <b>203</b>	<b>191</b> , 179, 173, 135	<b>85</b> , 127, 172
4,5-DiCQA		<b>353</b> , <b>203</b> , <b>299</b> , <b>255</b>	<b>173</b> , 179, 191, 135	<b>93</b> , 111
3- <i>p</i> Co,4CQA	499	<b>353</b> , 337, 335, 319, 299	<b>173</b> , 179, 191	
3C,4- <i>p</i> CoQA		<b>337</b> , 335, 319	<b>173</b> , 163	
3- <i>p</i> Co,5CQA		<b>337</b>	<b>163</b> , 173	
3C,5- <i>p</i> CoQA		<b>353</b>	<b>191</b>	
4- <i>p</i> Co,5CQA		<b>337</b> , 335	<b>173</b> , 163	
4C,5- <i>p</i> CoQA		<b>353</b> , 337, 299	<b>173</b>	
3F,4CQA	529	<b>353</b> , 367, 335, 349	<b>173</b> , 179, 191, 135	<b>134</b> , 149, 127
3C,4FQA		<b>367</b> , 335, 349	<b>173</b> , 193	<b>93</b> , 111, 127
3F,5CQA		<b>367</b> , 335	<b>193</b> , 173	<b>134</b> , 149, 127
3C,5FQA		<b>353</b> , 367	<b>191</b> , 179	<b>127</b> , 172
4F,5CQA		<b>367</b>	<b>173</b> , 193	<b>93</b> , 111, 127
4C,5FQA		<b>353</b> , 367	<b>173</b> , 179, 191, 135	<b>93</b> , 111, 127
3F,4- <i>p</i> CoQA	513	<b>349</b> , 319, 337, 367	<b>175</b> , 193	
3- <i>p</i> Co,4FQA		<b>349</b> , 367, 319, 337	<b>269</b> , 175	
3F,5- <i>p</i> CoQA		<b>367</b> , 337, 319, 349	<b>193</b> , 191	
3- <i>p</i> Co,5FQA		<b>337</b> , 367, 349, 319	<b>163</b>	
4F,5- <i>p</i> CoQA		<b>367</b> , 349, 319	<b>173</b> , 193	
4- <i>p</i> Co,5FQA		<b>337</b> , 367, 349, 319	<b>173</b> , 163	
3,4-DiFQA	543	<b>349</b> , 367	<b>175</b> , 193	
3,5-DiFQA		<b>367</b> , 349	<b>193</b> , 173	
4,5-DiFQA		<b>367</b> , 349	<b>173</b> , 193	
Catequina	289	<b>245</b> , 205, 203, 179	<b>203</b> , 227, 161, 175, 188, 187	
Epicatequina		<b>245</b> , 205, 203, 179	<b>203</b> , 227, 161, 175, 188, 187	
Procianidina B1	577	<b>425</b> , 289, 287		
Mangíferina	421	<b>301</b> , 331, 403	<b>258</b> , 273	

### Projeções obtidas para cada ensaio a partir da aplicação da ACP









## Anexo 7

Projecções das amostras dos grupos *am* e *pm* do 1º e 2º ensaios no espaço definido por duas componentes principais (ACP)

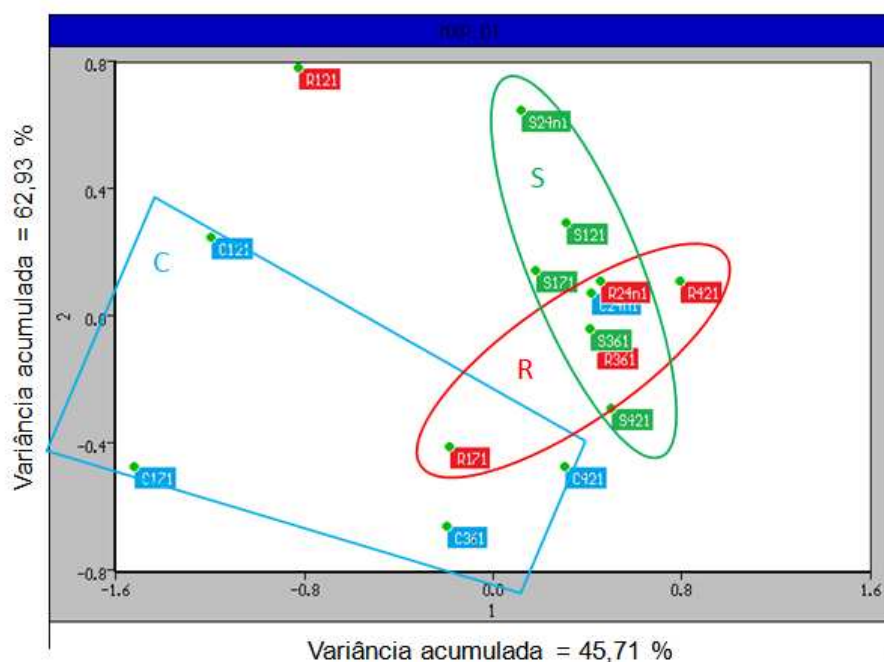


Figura 30 - Projecção das amostras C (controlo), R (resistente) e S (susceptível) do grupo *pm* (12, 17, 24, 36 e 42h após inoculação) do primeiro ensaio, no espaço definido pela primeira e segunda componentes principais

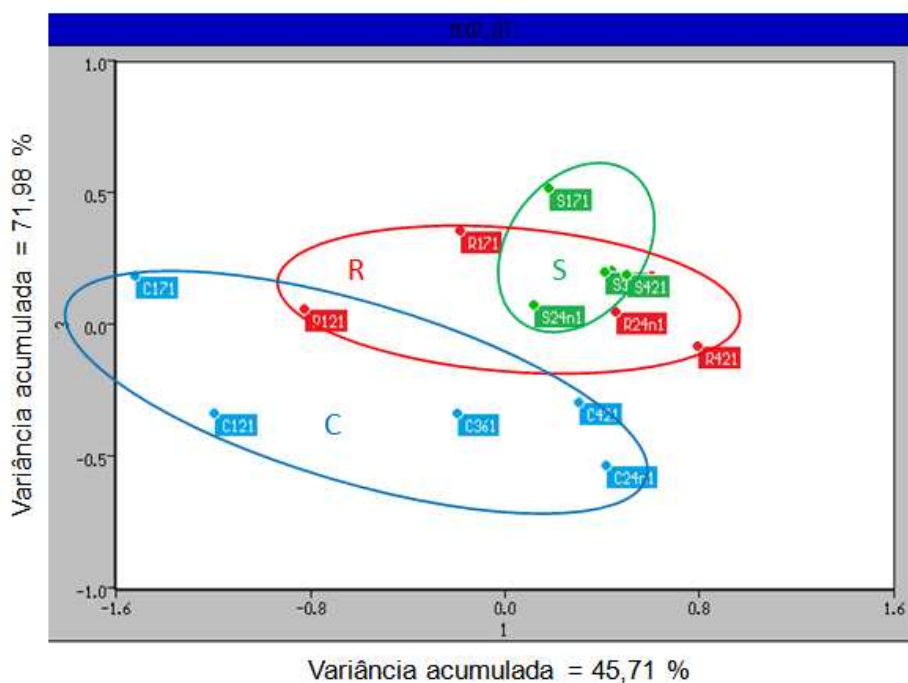


Figura 31 - Projecção das amostras C (controlo), R (resistente) e S (susceptível) do grupo *pm* (12, 17, 24, 36 e 42h após inoculação) do primeiro ensaio, no espaço definido pela primeira e terceira componentes principais

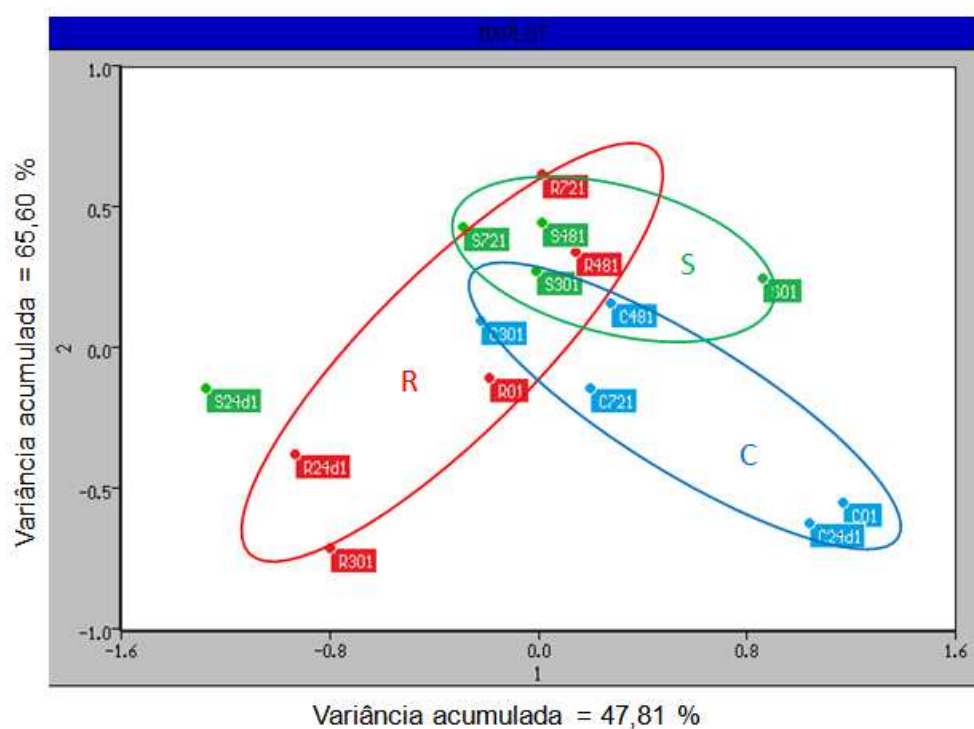


Figura 32 - Projecção das amostras C (controle), R (resistente) e S (susceptível) do grupo *am* (0, 24, 30, 48 e 72h após inoculação) do primeiro ensaio, no espaço definido pela primeira e segunda componentes principais

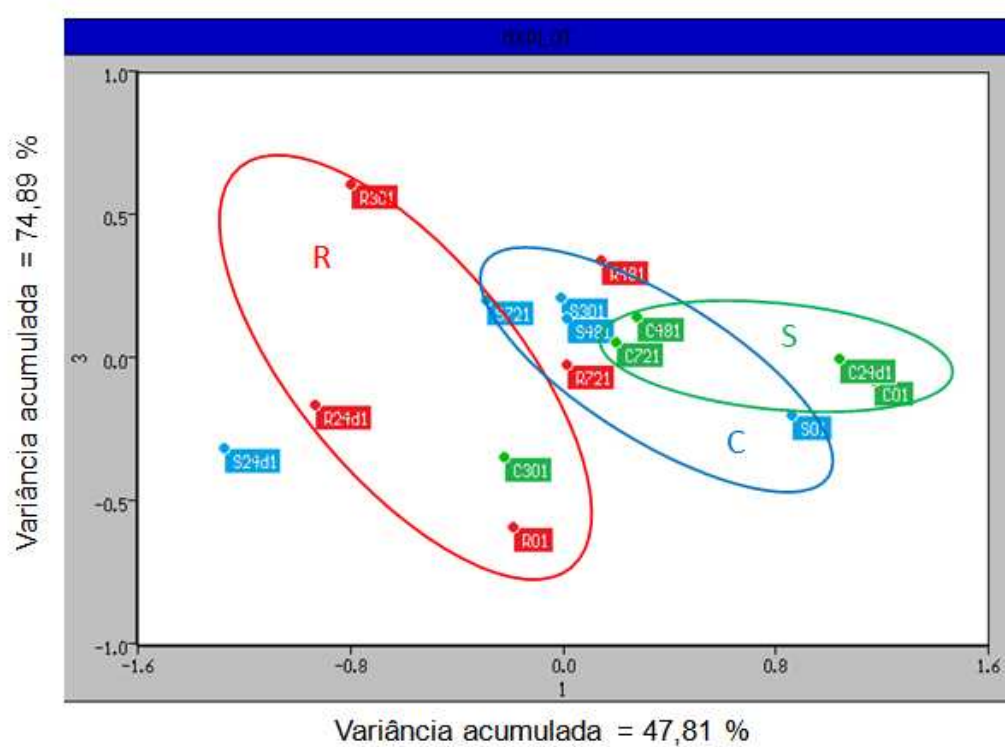


Figura 33 - Projecção das amostras C (controle), R (resistente) e S (susceptível) do grupo *am* (0, 24, 30, 48 e 72h após inoculação) do primeiro ensaio, no espaço definido pela primeira e terceira componentes principais

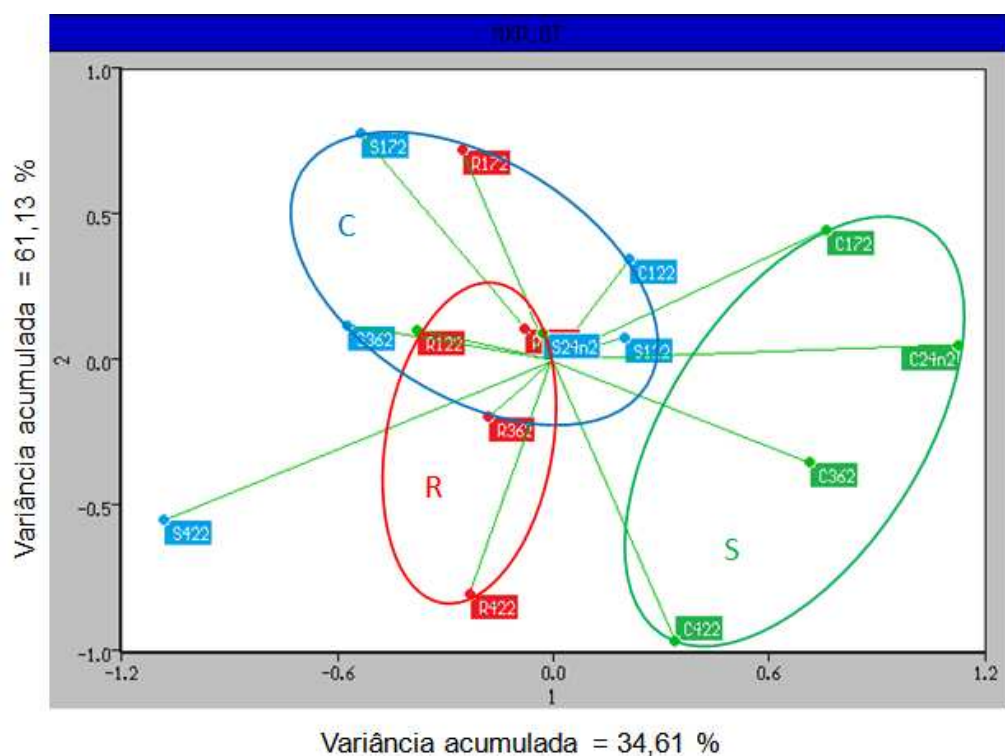


Figura 34 - Projecção das amostras C (controlo), R (resistente) e S (susceptível) do grupo *pm* (12, 17, 24, 36 e 42h após inoculação) do segundo ensaio, no espaço definido pela primeira e segunda componentes principais

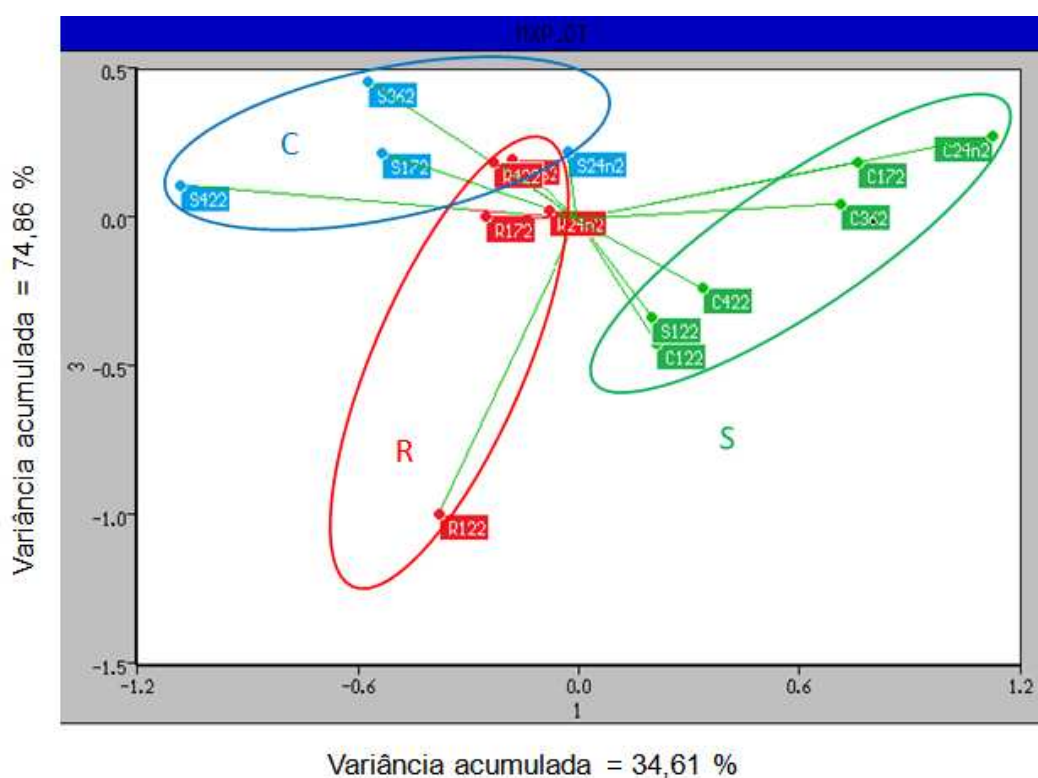


Figura 35 - Projecção das amostras C (controlo), R (resistente) e S (susceptível) do grupo *pm* (12, 17, 24, 36 e 42h após inoculação) do segundo ensaio, no espaço definido pela primeira e terceira componentes principais

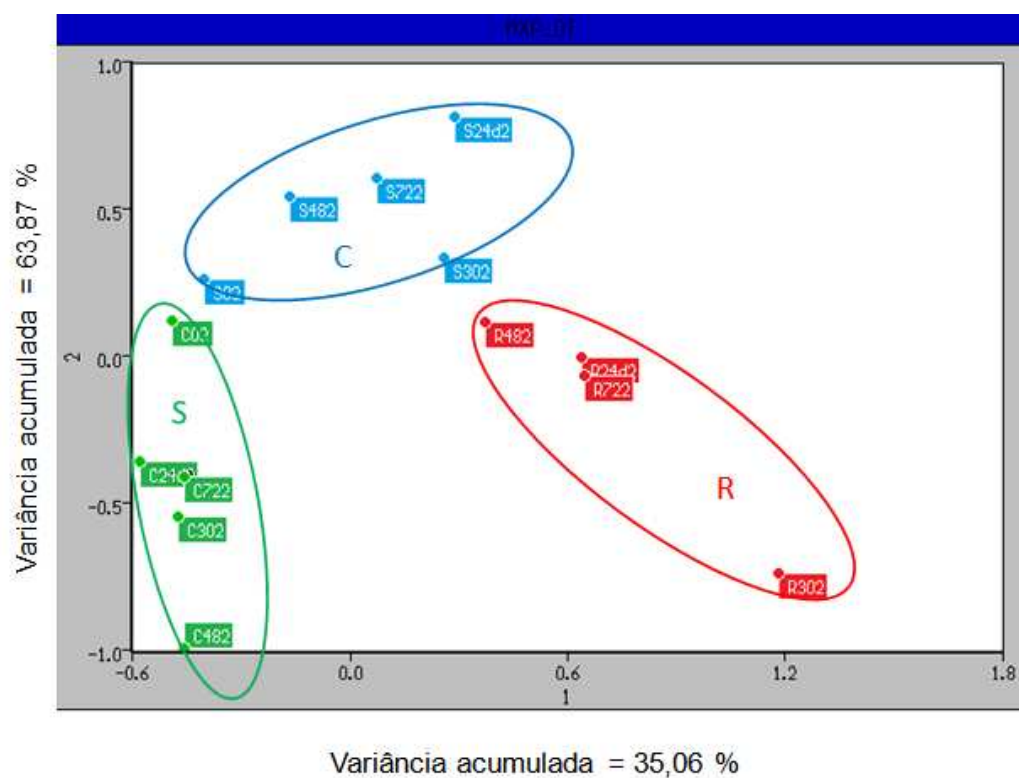


Figura 36 - Projecção das amostras C (controlo), R (resistente) e S (susceptível) do grupo *am* (12, 17, 24, 36 e 42h após inoculação) do segundo ensaio, no espaço definido pela primeira e segunda componentes principais

## Anexo 8

### Projecções das amostras e variáveis do 1º e 2º ensaios (ACP)

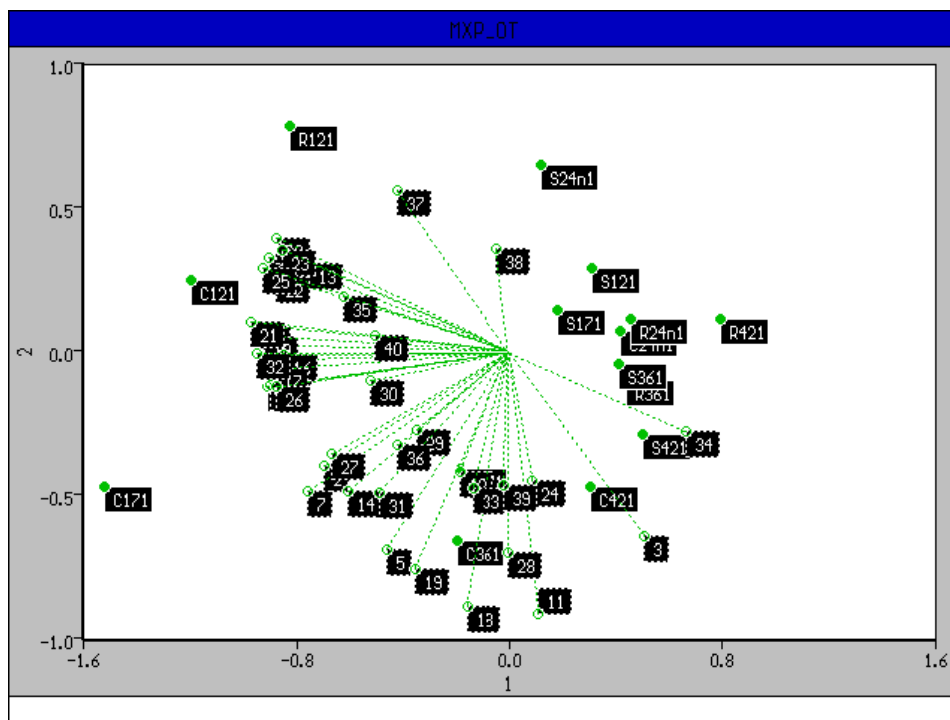


Figura 37 - Projecção das amostras C (controlo), R (resistente) e S (susceptível) e das 40 variáveis do grupo *pm* (12, 17, 24, 36 e 42h após inoculação) do primeiro ensaio, no espaço definido pela primeira e segunda componentes principais

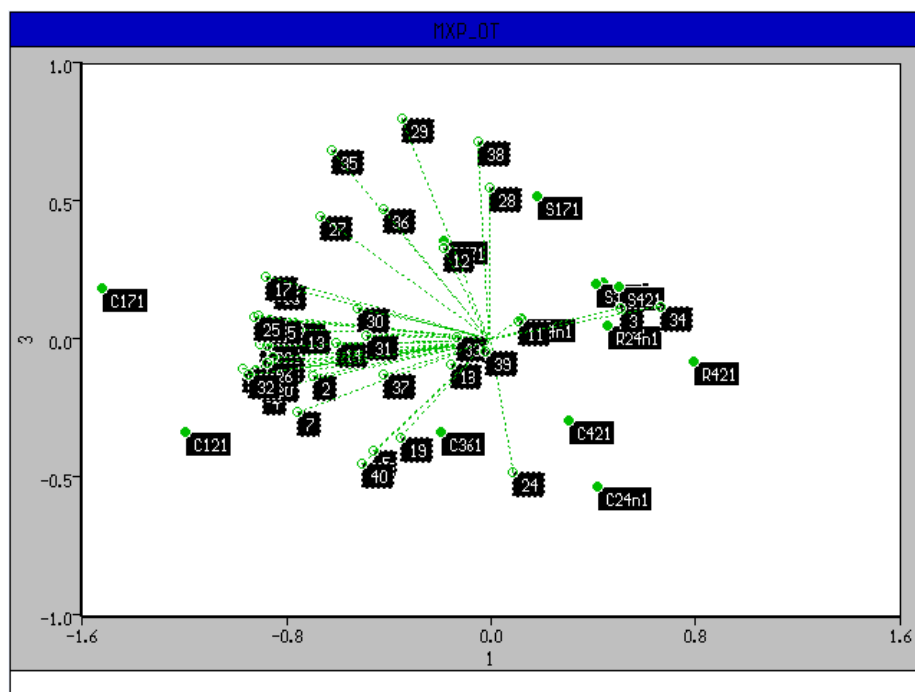


Figura 38 - Projecção das amostras C (controlo), R (resistente) e S (susceptível) e das 40 variáveis do grupo *pm* (12, 17, 24, 36 e 42h após inoculação) do primeiro ensaio, no espaço definido pela primeira e terceira componentes principais

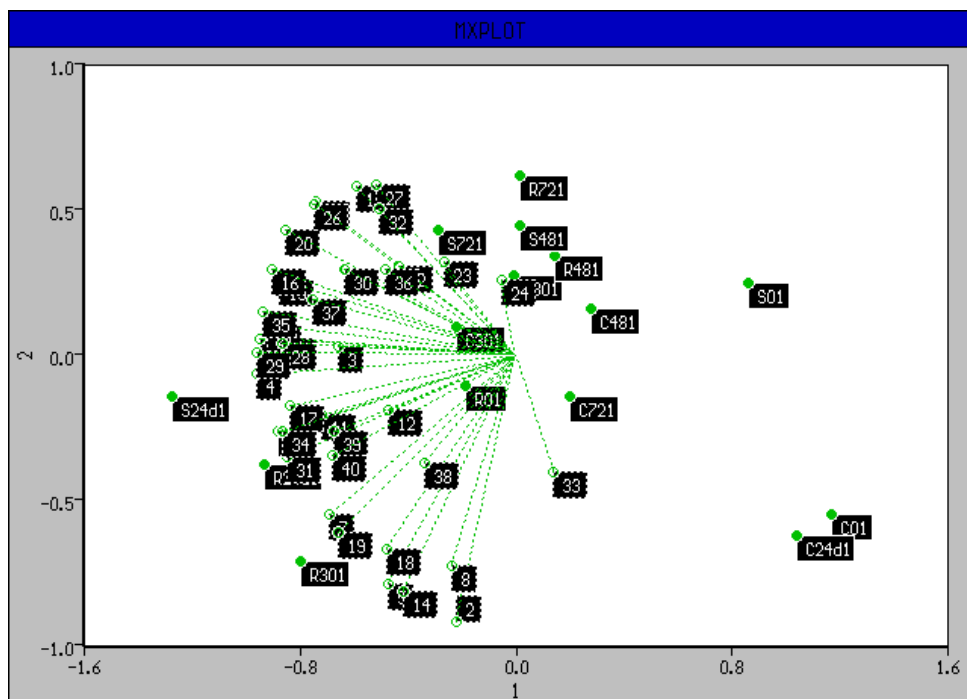


Figura 39 - Projecção das amostras C (controlo), R (resistente) e S (susceptível) e das 40 variáveis do grupo *am* (0, 24, 30, 48 e 72h após inoculação) do primeiro ensaio, no espaço definido pela primeira e segunda componentes principais

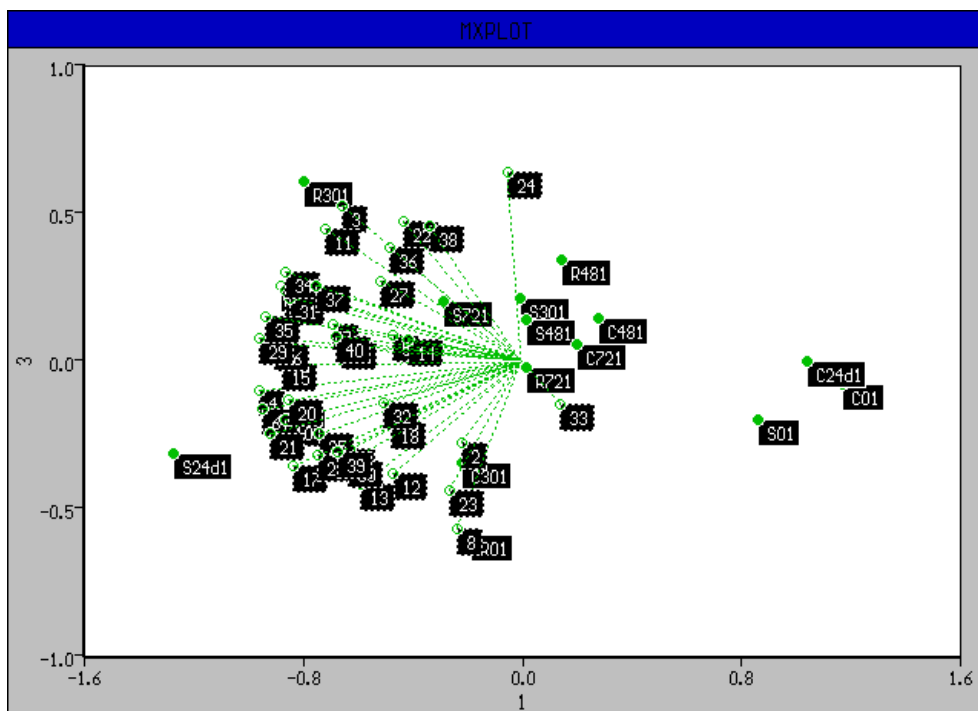


Figura 40 - Projecção das amostras C (controlo), R (resistente) e S (susceptível) e das 40 variáveis do grupo *am* (0, 24, 30, 48 e 72h após inoculação) do primeiro ensaio, no espaço definido pela primeira e terceira componentes principais

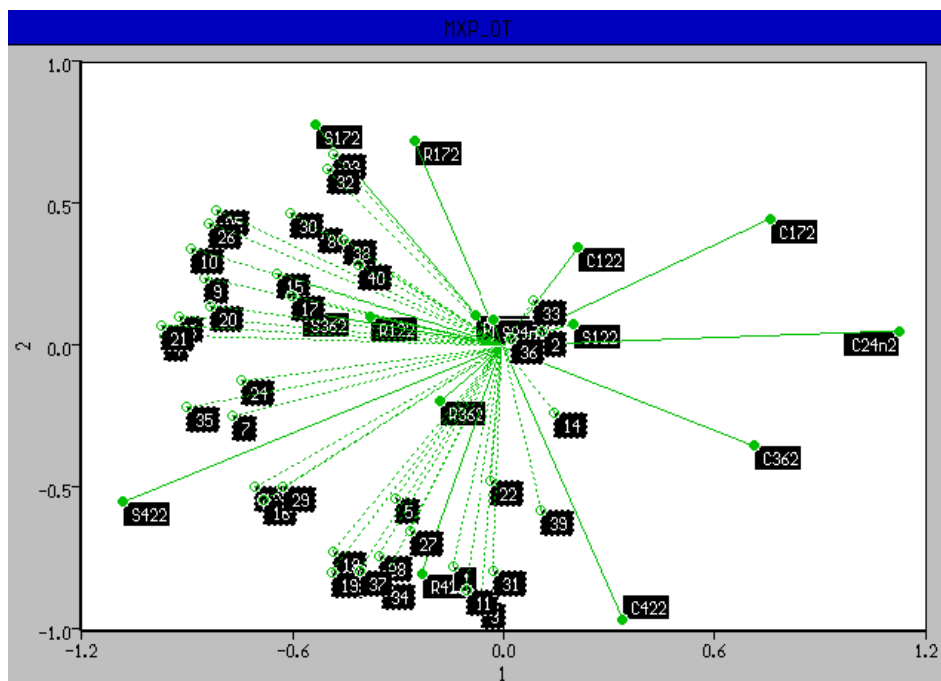


Figura 41 - Projecção das amostras C (controlo), R (resistente) e S (susceptível) e das 40 variáveis do grupo *pm* (12, 17, 24, 36 e 42h após inoculação) do segundo ensaio, no espaço definido pela primeira e segunda componentes principais

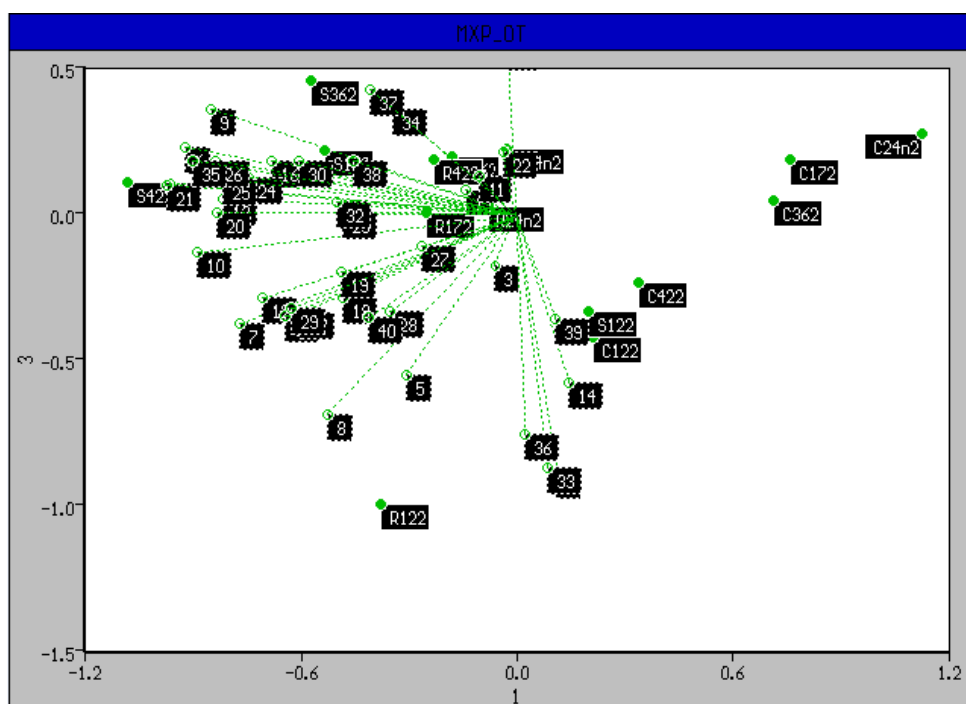


Figura 42 - Projecção das amostras C (controlo), R (resistente) e S (susceptível) e das 40 variáveis do grupo *pm* (12, 17, 24, 36 e 42h após inoculação) do segundo ensaio, no espaço definido pela primeira e terceira componentes principais



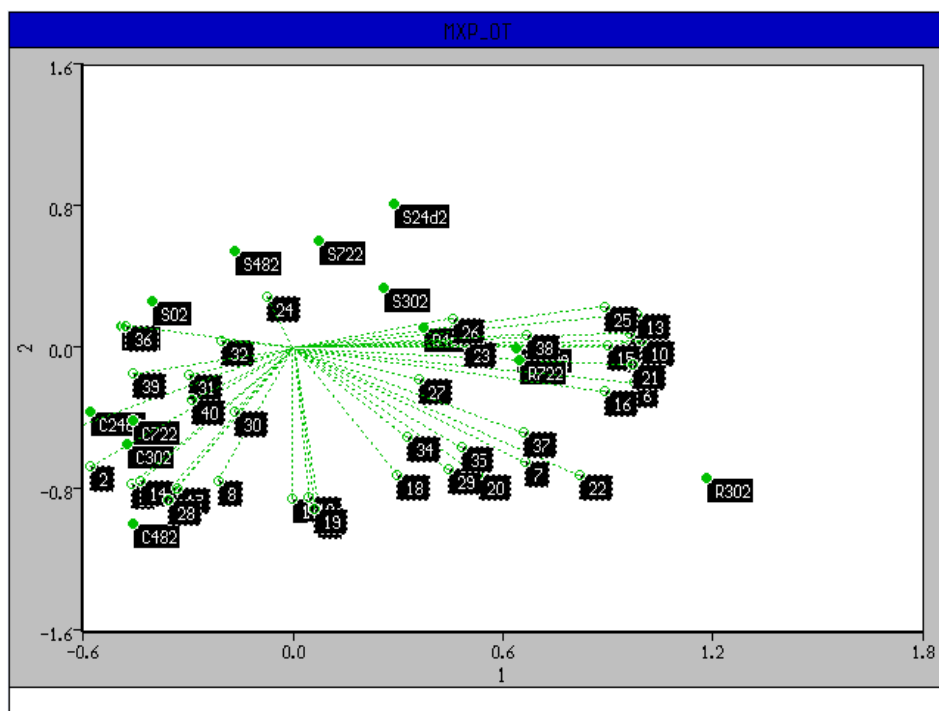
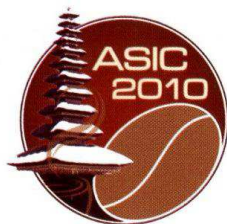


Figura 43 - Projecção das amostras C (controle), R (resistente) e S (susceptível) e das 40 variáveis do grupo *am* (0, 24, 30, 48 e 72h após inoculação) do segundo ensaio, no espaço definido pela primeira e segunda componentes principais



The 23<sup>rd</sup> International  
Conference on Coffee Science  
Bali, Indonesia  
October 3 - 8, 2010



# PROGRAMME & ABSTRACTS



ASSOCIATION FOR SCIENCE AND INFORMATION ON COFFEE  
ASSOCIATION POUR LA SCIENCE ET L'INFORMATION SUR LE CAFE

# PB750

## CHLOROGENIC ACID CONTENT IN COFFEE LEAVES: POSSIBLE ROLE IN COFFEE LEAF RUST RESISTANCE

LEITÃO, Sofia\*\*\*, GUERRA-GUIMARÃES, Leonor\*, BRONZE, M. Rosário\*\*, VILAS BOAS, Luís\*\*, SÁ, Marta\*\*\*, ALMEIDA, Maria H.G.\*\*\*, SILVA, Maria do Céu\*

\* Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro (CIFC), Instituto de Investigação Científica Tropical (IICT), Oeiras, Portugal, \*\* Instituto de Biologia Experimental e Tecnológica (IBET), Oeiras, Portugal, \*\*\* Agronomia Tropical, Instituto Superior de Agronomia (ISA), Universidade Técnica de Lisboa (UTL), Lisboa, Portugal

The resistance of Coffee arabica S4 Agaro to *Hemileia vastatrix* is characterized by a rapid localized plant cell death (hypersensitive reaction-HR), associated with a restriction of fungal growth, early increase in phenylalanine ammonia-lyase (PAL) activity and accumulation of phenolic compounds. This work aims to understand the involvement of chlorogenic acids (CGAs) in coffee resistance particularly during HR. *C. arabica* S4 Agaro leaves in the first stages of the infection process of *H. vastatrix* (compatible and incompatible interactions) were collected, grounded and extracted with a methanol-water mixture. Extracts were treated with Carrez reagents, filtered and then analysed by HPLC-DAD (high performance liquid chromatography with detection at 325 nm) and HPLC-MS/MS (high performance liquid chromatography with detection by mass spectrometry) using a triple quadrupole equipment with an ESI (electrospray) source operating in negative mode. The main caffeoylquinic acids (CQA), dicaffeoylquinic acids (diCQA) and feruloylquinic acids (FQA) detected in the leaves of *C. arabica* S4 Agaro were quantified using CGA as standard. For identification MS and MS/MS spectra were compared with literature as for most compounds standards are not commercially available. Preliminary results showed a differential accumulation of CGAs during the time course of the experience, suggesting the possible involvement of some of these compounds in the resistance response of coffee against *H. vastatrix*.



## Referências bibliográficas

ALONSO-SALCES, R. M.; GUILLOU, C.; BERRUETA, L. A. (2009) - Liquid chromatography coupled with ultraviolet absorbance detection, electrospray ionization, collision induced dissociation and tandem mass spectrometry on a triple quadrupole for the on-line characterization of polyphenols and methylxanthines in green coffee beans. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **23**: 363–383.

ATTITALLA, I. H. (2004) – Biological and molecular characteristics of microorganism-stimulated defense response in *Lycopersicon esculentum* L. – Acta Universitatis Upsaliensis. *Comprehensive summaries of Uppsala dissertations from the Faculty of Science and Technology* 943, 14 pp.

BELAY, A.; GHOLAP, A. V. (2009) - Characterization and determination of chlorogenic acids (CGA) in coffee beans by UV-Vis spectroscopy. *African Journal of Pure and Applied Chemistry*, **3** (11): 234-240.

BERTRAND, C.; NOIROT, M.; DOULBEAU, S.; DE KOCHKO, A.; HAMON, S.; CAMPA, C. (2003) - Chlorogenic acid content swap during fruit maturation in *Coffea pseudozanguebariae* Qualitative comparison with leaves. *Plant Science*, **165**:1355–1361

BETTENCOURT, A. J.; RODRIGUES JR., C. J. (1988) - Principles and practice of coffee breeding for resistance to rust and other diseases. In: CLARKE, R. J. & MACRAE, R., *Coffee Agronomy*, Vol. 4, London and New York, Elsevier Applied Science Publishers LTD, 199-234.

BETTENCOURT, A. J. (1981). Melhoramento genético do cafeeiro: Transferência de factores de resistência à *Hemileia vastatrix* Berk. & Br. para as principais cultivares de *Coffea arabica* L.. Junta de Investigações Científicas do Ultramar, Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro, Lisboa. pp. 93

BI, J. L.; FELTON, G. W.; MURPHY, J. B.; HOWLES, P. A.; DIXON, R. A. E LAMB, C. J. (1997) - Do Plant Phenolics Confer Resistance to Specialist and Generalist Insect Herbivores? *J. Agric. Food Chem.*, **45**: 4500-4504.

BICCHI, C. P.; BINELLO, A. E.; PELLEGRINO, G. M.; VANNI, A. C. (1995) - Characterization of green and roasted coffees through the chlorogenic acid fraction by HPLC-UV and principal component analysis. *J. Agric. Food Chem.*, **43**: 1549-1555.

BICHO, N. C. C. (2008) – Estudo de alguns parâmetros cromáticos, sensoriais, tecnológicos, físicos e químicos do grão de café. Dissertação Provas Doutorado, Lisboa, Faculdade de Ciências e Tecnologia/Universidade Nova de Lisboa, pp. 323

CAHILL, D. M.; MCCOMB, J. A. (1992) - A comparison of changes in phenylalanine ammonia-lyase activity, lignin and phenolic synthesis in the roots of *Eucalyptus calophylla* (field resistance) and *E. marginata* (susceptible) when infected with *Phytophthora cinnamomi*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **40**: 315-332.

CAMPA, C.; DOULBEAU, S.; DUSSERT, S.; HAMON, S.; NOIROT, M. (2005) - Qualitative relationship between caffeine and chlorogenic acid contents among wild *Coffea* species. *Food Chemistry*, **93**: 135–139.

CARVER, T. L. W.; THOMAS, B. J.; ROBBINS, M. P.; ZEYEN, R. J. (1998) - Phenylalanine ammonia-lyase inhibition, autofluorescence, and localized accumulation of silicon, calcium and manganese in oat epidermis attacked by the powdery mildew fungus *Blumeria graminis* (DC) Speer. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **52**: 223-243.

CHAPMAN, J.R. (1993) – *Practical Organic Mass Spectrometry*, Second Edition, West Sussex, John Wiley and Sons Ltd., pp. 1-2, 239-240.

CHARRIER, A.; BERTHAUD, J. (1985) - Botanical classification of Coffee. In: CLIFFORD, M.N. e WILLSON, K.C. (eds.), *Coffee: botany, biochemistry, and production of beans and beverage*, Londres, Croom Helm, pp.13-47.

CHEVALIER, A. (1947) - *Les caféiers du globe III: systématique des caféiers et faux-caféiers, maladies et insectes nuisibles*, Paris, Le Chevalier, pp. 356

CLARKE, R. J. (1985) - Green coffee processing. In: CLIFFORD, M.N. e WILLSON, K.C. (eds.), *Coffee: botany, biochemistry, and production of beans and beverage*, Londres, Croom Helm, pp. 230-250.

CLÉ, C.; HILL, L. M.; NIGGEWEG, R.; MARTIN, C. R.; GUISEZ, Y.; PRINSEN, E.; JANSEN, M. A. K. (2008) - Modulation of chlorogenic acid biosynthesis in *Solanum lycopersicum*; consequences for phenolic accumulation and UV-tolerance. *Phytochem.* **69**: 2149–2156.

CLIFFORD, M. N.; JOHNSTON, K. L.; KNIGHT, S.; KUHNERT, N. (2003) - Hierarchical scheme for LC-MS<sup>n</sup> identification of chlorogenic acids. *J. Agric. Food Chem.*, **51** (10): 2900-2911

CLIFFORD, M. N.; MARKS, S.; KNIGHT, S. E KUHNERT, N. (2005) - Discriminating between the six isomers of dicaffeoylquinic acid by LC-MS<sup>n</sup>. *J. Agric. Food Chem.* **53**: 3821-3832

CLIFFORD, M. N.; ZHENG, W.; KUHNERT, N. (2006a) - Profiling the chlorogenic acids of *Aster* by HPLC–MS<sup>n</sup>. *Phytochem. Anal.* **17**: 384–393

CLIFFORD, M. N.; MARKS, S.; KNIGHT, S.; KUHNERT, N. (2006b) - Characterization by LC-MS<sup>n</sup> of four new classes of p-coumaric acid-containing diacyl chlorogenic acids in green coffee beans. *J. Agric. Food Chem.*, **54**: 4095-4101.

CLIFFORD, M. N.; WU, W.; KUHNERT, N. (2006c) - The chlorogenic acids of *Hemerocallis*. *Food Chem.* **95**: 574–578.

CLIFFORD, M. N.; KIRKPATRICK, J.; KUHNERT, N.; ROOZENDAAL, H. E SALGADO, P. R. (2008) - LC–MS<sup>n</sup> Analysis Of The Cis Isomers Of Chlorogenic Acids. *Food Chem.*, **106**: 379–385.

COHEN, Y.; EYAL, H.; HANANIA, J. (1990) - Ultrastructure, autofluorescence, callose deposition and lignification in susceptible and resistant muskmelon leaves infected with the powdery mildew fungus *Sphaerotheca fuliginea*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **36**: 191-204.

CORREIA, A. M. N. G. (1990) - *Influência da Torra na Evolução dos Ácidos Clorogénicos do Café*. Dissertação Provas Doutoramento em Engenharia Agro-Industrial, Lisboa, Instituto Superior de Agronomia/Universidade Técnica de Lisboa, pp. 56-57, 180-181.

D'OLIVEIRA, B.; RODRIGUES JR., C. J. (1961) - O problema das ferrugens do cafeeiro. *Revista do Café Português*, **8**: 5-50.

D'OLIVEIRA, B. (1954-57) - As ferrugens do cafeeiro. *Revista do Café Português*. **1**: 5-13, **2**: 5-12, **2**: 5-15, **2**: 9-187, **2**: 5-22, **4**: 5-15.

DAVIS, A. P.; GOVAERTS, R.; BRIDSON, D. M.; STOFFELEN, P. (2006) - An annotated taxonomic conspectus of the genus *Coffea* (Rubiaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, **152**: 465–512.

DE MARIA, C. A. B.; MOREIRA, R. F. A. (2004) - Métodos para análise de ácido clorogênico. *Quim. Nova*, **27** (4): 586-592.

DINIZ, I.; TALHINHAS, P.; AZINHEIRA, H.G.; VÁRZEA, V.; OLIVEIRA, H.; FERNANDEZ, D.; SILVA, M. C. (2010) - Cellular and molecular responses in host and non-host coffee-rust interactions (*Hemileia vastatrix* and *Uromyces vigneae*). In: Proceedings of the 23th International Conference on Coffee Science (ASIC), Bali, Indonesia, 3-7 Outubro 2010 (em publicação).

FANG, N.; YU, S.; PRIOR, R. L. (2002) - LC/MS/MS Characterization of Phenolic Constituents in Dried Plums. *J. Agric. Food Chem.* **50**: 3579-3585.

FARAH, A.; DONANGELO, C. M. (2006) - Phenolic Compounds in Coffee. *Braz. J. Plant Physiol.*, **18** (1): 23-36.

FERNANDEZ, D.; SANTOS, P.; AGOSTINI, C.; BON, M.; PETITOT, A.; SILVA, M. C.; GUERRA-GUIMARÃES, L.; RIBEIRO, A.; ARGOUT, X.; NICOLE, M. (2004). Coffee (*Coffea arabica* L.) genes early expressed during infection by the rust fungus (*Hemileia vastatrix*). *Molecular Plant Pathology* **5**: 527-536.

FERRÃO, J. E. M. (2005) - *A Aventura das Plantas e os Descobrimentos Portugueses*, Lisboa, Chaves Ferreira Publicações, pp. 254-261.

FLOR, H. H. (1942) - Inheritance of pathogenicity in *Melampsora lini*. *Phytopathology* **32**: 653-669.

FRITZ, S. J.; SCHENK, G. H. (1987) - *Quantitative Analytical Chemistry*, fifth edition, Massachusetts, Allyn and Bacon Inc., pp. 483-488.

GANESH, D.; PETITOT, A.; SILVA, M. C.; ALARY, R.; LECOULS, A. C.; FERNANDEZ, D. (2006) - Monitoring of the early molecular resistance responses of coffee (*Coffea arabica* L.) to the rust fungus (*Hemileia vastatrix*) using real-time quantitative RT-PCR. *Plant Sciences*, **170**: 1045-1051.

GLAZEBROOK, J. (2005) - Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.*, **43**: 205-227.

GONZALÉZ, J.; REYES, F.; SALAS, C. ; SANTIAGO, M.; CODRIANSKY, Y.; COLIHEUQUE, N. E SILVA, H. (2006) - *Arabidopsis thaliana*: a model host plant to study plant-pathogen interaction using chilean field isolates of *Botrytis cinerea*. *Biol. Res.*, **39**: 221-228.

GUERRA-GUIMARÃES, L.; CARDOSO, S.; MARTINS, I.; LOUREIRO, A.; BERNARDES DA SILVA, A.; VÁRZEA, V. M. P.; SILVA, M. C. (2008) - Differential induction of superoxide dismutase in *Coffea arabica* - *Hemileia vastatrix* interactions In: Proceedings of the 22th International Conference on Coffee Science (ASIC), Campinas, 14-19 Setembro 2008, pp. 1036-1039.

GUERRA-GUIMARÃES, L.; SILVA, M. C.; STRUCK, C.; LOUREIRO, A.; NICOLE, M.; RODRIGUES JR., C. J.; RICARDO, C. P. P. (2009) - Chitinases of *Coffea arabica* genotypes resistant to orange rust *Hemileia vastatrix*. *Biologia Plantarum*, **53**: 702-706.

GUZZO, S. D.; MARTINS, E. M. F. (1996) - Local and systemic induction of  $\beta$ -1,3-glucanase and chitinase in coffee leaves protected against *Hemileia vastatrix* by *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Phytopathology*, **144**: 449-454.

KORKINA, L.G. (2007) - Phenylpropanoids as naturally occurring antioxidants: from plant defense to human health. *Celular and Molecular Biology* **53** (1): 15-25.

KUĆ, J. (1997) - Molecular aspects of plant responses to pathogens. *Acta Physiologiae Plantarum*, **19** (4): 551-559.



KY, C.-L.; NOIROT, M. E HAMON, S. (1997) - Comparison of five purification methods for chlorogenic acids in green coffee beans (*Coffea* sp.). *J. Agric. Food Chem.*, **45**: 786-790.

KY, C.-L.; LOUARN, J.; GUYOT, B.; CHARRIER, A.; HAMON, S. E NOIROT, M.; (1999) - Relations between and inheritance of chlorogenic acid contents in an interspecific cross between *Coffea pseudozanguebariae* and *Coffea liberica* var 'dewevrei'. *Theor. Appl. Genet.*, **98**: 628-637.

KY, C.-L.; LOUARN, J.; DUSSERT, S.; GUYOT, B.; HAMON, S.; NOIROT, M. (2001) - Caffeine, trigonelline, chlorogenic acids and sucrose diversity in wild *Coffea arabica* L. and *C. canephora* P. accessions. *Food Chem.*, **75**: 223-230.

LEISS, K. A.; MALTESE, F.; CHOI, Y. H.; VERPOORTE, R.; E KLINKHAMER, P. G. L. (2009) - Identification of chlorogenic acid as a resistance factor for thrips in *Chrysanthemum*. *Plant Physiology*, **150**: 1567-1575.

LEITÃO, S.; GUERRA-GUIMARÃES, L.; BRONZE, M. R.; VILAS BOAS, L.; SÁ, M.; ALMEIDA, M. H. G.; SILVA, M. C. (2010) – Chlorogenic acid content in coffee leaves: possible role in coffee leaf rust resistance, *In*: Proceedings of the 23th International Conference on Coffee Science (ASIC), Bali, Indonesia, 3-7 Outubro 2010 (em publicação).

LEPELLEY, M.; CHEMINADE, G.; TREMILLON, N.; SIMKIN, A.; CAILLET, V.; MCCARTHY, J. (2007) - Chlorogenic acid synthesis in coffee: An analysis of CGA content and real-time RT-PCR expression of HCT, HQT, C3H1, and CCoAOMT1 genes during grain development in *C. canephora*. *Plant Science*, **172**: 978-996.

MAHER, E. A.; BATE, N. J.; NI, W.; ELKIND, Y. ; DIXON, R. A. E LAMB, C. J. (1994) - Increased disease susceptibility of transgenic tobacco plants with suppressed levels of preformed phenylpropanoid products. *Proc. Nati. Acad. Sci.*, **91**: 7802-7806.

MAXEMIUC-NACCACHE, V.; BRAGA, M. R.; DIETRICH, S.M.C. (1992) - Chitinase and  $\beta$ -1,3-glucanase changes in compatible and incompatible combinations between coffee leaf disks and coffee rust (*Hemileia vastatrix*). *Revista Brasileira de Botânica*, **15**: 145-150.

MCMULLEN, M. D.; FREY, M.; DEGENHARDT, J. (2009). *Genetics and Biochemistry of Insect Resistance in Maize*, In: J.L. Bennetzen and S.C. Hake (eds.), *Handbook of Maize: It's Biology*, Nova Iorque, Springer Science + Business Media, pp. 271 - 284

MENDHAM, J.; DENNEY, R. C.; BARNES, J. D.; THOMAS, M. (2002) – *Análise Química Quantitativa*, Sexta Edição, Rio de Janeiro, LTC, pp. 410-411.

MONDOLOT, L.; LA FISCA, P.; BUATOIS, B.; TALANSIER, E.; DE KOCHKO, A.; CAMPA, C. (2006) - Evolution in caffeoylquinic acid content and histolocalization during coffeea canephora leaf development. *Annals of Botany*, **98**: 33–40.

MUSELÍK, J.; GARCÍA-ALONSO, M.; MARTÍN-LÓPEZ, M. P.; ŽEMLIČKA, M.; RIVAS-GONZALO, J. C. (2007) - Measurement of Antioxidant Activity of Wine Catechins, Procyanidins, Anthocyanins and Pyranoanthocyanins. *Int. J. Mol. Sci.*, **8**: 797-809.

NICHOLSON, R. L.; HAMMERSCHMIDT, R. (1992) - Phenolic compounds and their role in disease resistance. *Annual Review of Phytopathology*, **30**: 369-371.

NORONHA-WAGNER, H.; BETTENCOURT, A. J. (1967) - Genetic study of the resistance of *Coffea* spp. to leaf rust. Identification and behaviour of four factors conditioning disease reaction in *Coffea arabica* to twelve physiologic races of *Hemileia vastatrix*. *Canadian Journal Botany*, **45**: 2021-2031.

NUTMAN, F. J.; ROBERTS, F.M.; CLARKE, R.T. (1963) - Studies on the Biology of *Hemileia vastatrix* Berk. & Br.. *Transactions of the British Mycological Society*, **46** (1): 27-44.

PETITOT, A; LECOULS, A; FERNANDEZ, D. (2008) - Sub-genomic origin and regulation patterns of a duplicated WRKY gene in the allotetraploid species *Coffea arabica*. *Tree Genetics and Genomes*, **4**: 379-390.

PETKOVSEK, M. M.; USENIK, V. E. ŠTAMPAR, F. (2003) - The role of chlorogenic acid in the resistance of apples to apple scab (*Venturia inaequalis* (Cooke) G. Wind. Aderh.). *Zb. Bioteh. Fak. Univ. Ljublj. Kmet.* **81**: 233 – 242.

PRAKASH, N. S.; MARQUES, D. V.; VARZEA, V. M. P.; SILVA, M. C.; COMBES, M. C.; LASHERMES, P. (2004) - Introgression molecular analysis of a leaf rust resistance gene from *Coffea liberica* into *C. arabica* L.. *Theor Appl Genet*, **109**: 1311–1317.

RAMIRO, D. (2009) - Caractérisation des mécanismes de résistance impliqués dans les réponses du caféier (*Coffea arabica*) à l'agent de la rouille orangée (*Hemileia vastatrix*): de la formation des haustoria à l'expression quantitative des gènes, Tese de Doutorado, Montpellier, Montpellier-SupAgro. pp. 229

RIJO, L.; VASCONCELOS, M. I. (1984) - Formação de calose e lenhina em combinações incompatíveis *Coffea* spp. - *H. vastatrix*. In: *Simpósio sobre Ferrugens do Cafeeiro*, Oeiras, 17-20 Outubro 1983, pp. 269-279.

RIJO, L.; RODRIGUES JR., C. J. (1978) - Processo de infecção da *Hemileia vastatrix* Berk. & Br. em cultivares susceptíveis e resistentes de *Coffea arabica* L.. Sep. Garcia da Orta, Sér. Estação Agronómica, **5** (1-2): 23-24.

RODRIGUES JR., C. J.; BETTENCOURT, A. J.; RIJO L. (1975) - Races of the Pathogen and Resistance to Coffee Rust. *Annual Review of Phytopathology*, **13**: 49-70.

RODRIGUES JR., C. J.; RIJO, L.; MEDEIROS, E. F. (1980) - Germinação anômala dos uredósporos de *Hemileia vastatrix*, o agente causal da ferrugem alaranjada do cafeeiro. Sep. Garcia da Orta, Sér. Estação Agronómica, **7** (1-2): 17-20.

ROJAS, M. L.; MONTES DE GÓMEZ, V.; OCAMPO, C. A. (1993) - Stimulation of lipoxygenase activity in cotyledonary leaves of coffee reacting hypersensitively to the coffee leaf rust. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **43**: 209-219.

SCHIEBER, A.; BERARDINI, N.; CARLE, R. (2003) - Identification of Flavonol and Xanthone Glycosides from Mango (*Mangifera indica* L. Cv. "Tommy Atkins") Peels by High-Performance Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **51**: 5006-5011.

SCOTT, R. P. W. (1994) - *Liquid Chromatography for the Analyst*, Nova Iorque, Marcel Dekker Inc., pp. 1-8, 123-124, 165-176.

SILVA, M. C.; GUERRA-GUIMARÃES, L.; LOUREIRO, A.; NICOLE, M. R. (2008) - Involvement of peroxidases in the coffee resistance to orange rust (*Hemileia vastatrix*). *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **72**: 29-38.

SILVA, M. C.; NICOLE, M.; GUERRA-GUIMARÃES, L.; RODRIGUES JR., C. J. (2002) - Hypersensitive cell death and post-haustorial defense responses arrest the orange rust (*Hemileia vastatrix*) growth in resistant coffee leaves. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **60**: 169-183.

SILVA, M. D.; VÁRZEA, V.; GUIMARÃES, L. G.; AZINHEIRA, H. G.; FERNANDEZ, D.; PETITOT, A. S.; BERTRAND, B.; LASHERMES, P.; NICOLE, M. (2006) - Coffee resistance to the main diseases: leaf rust and coffee berry disease. *Braz. J. Plant Physiol.*, **18** (1): 119-147.

SINGH, D.P. & SINGH, A. (2005) - *Disease and Insect Resistance in Plants*, New Hampshire, Science Publishers, pp. 40-41.

SIVETZ, M.; DESROSIER, N. W.; (1979) - *Coffee Technology*, Connecticut, AVI Publishing Company, pp. 3-4, 79-102, 117-124, 249-254, 602-603, 279-280, 287-288.

SMITH, R.F. (1985) - History of coffee. In: CLIFFORD, M. N. & WILSON, K. C. (eds.), *Coffee: Botany, Biochemistry and Production of Beans and Beverage*, Londres, Croom Helm, pp. 1-5

STALMACH, A.; MULLEN, W.; NAGAI, C.; CROZIER, A. (2006) - On-line HPLC analysis of the antioxidant activity of phenolic compounds in brewed, paper-filtered coffee. *Braz. J. Plant Physiol.*, **18** (1): 253-262.

STASKAWICZ, B. J. (2001) - Genetics of plant-pathogen interactions specifying plant disease resistance. *Plant Physiol.*, **125**: 73-76.

STERGIOPOULOS, I.; DEWIT, P. J. G. M. (2009) - Fungal effector proteins. *Annu. Rev. Phytopathol.*, **47**: 233–63.

STINTZING, F. C.; KAMMERER, D.; SCHIEBER, A.; ADAMA, H.; ODILE G. NACOULMA, H. G.; CARLE, R. (2004) - Betacyanins and Phenolic Compounds from *Amaranthus spinosus* L. and *Boerhavia erecta* L.. *Z. Naturforsch.*, **59c**: 1-8.

STOILLOVA, I.; JIROVETZ, L.; STOYANOVA, A.; KRASTANOV, A.; GARGOVA, S.; HO, L. (2008) - Antioxidant activity of the polyphenol mangiferin. *Electronic Journal of Environmental, Agriculture and Food Chemistry*, 7 (13): 2706-2716

TALAMOND, P.; MONDOLOT, L.; GARGADENNEC, A.; DE KOCHKO, A.; HAMON, S.; FRUCHIER, A.; CAMPA C. (2008) – First report of mangiferin (C-glucosyl xanthone) isolated from leaves of a wild coffee plant, *Coffea pseudozanguebariae*. *Acta Bot Gallica* **155**(4): 513-519.

TOMÁS-BARBERÁN, F. A.; GIL, M. I.; CREMIN, P.; WATERHOUSE, A. L.; HESS-PIERCE, B.; KADER, A. A. (2001) - HPLC-DAD-ESIMS Analysis of phenolic compounds in nectarines, peaches, and plums. *J. Agric. Food Chem.*, **4**: 4748-4760

VANACKER, H.; CARVER, T. L.; FOYER, C. H. (2000) - Early H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation in mesophyll cells leads to induction of glutathione during the hypersensitive response in the barley-powdery mildew interaction. *Plant Physiology* **123**: 1289-1300.

VÁRZEA, V. M. P.; MARQUES, D. V. (2005) - Population variability of *Hemileia vastatrix* vs. coffee durable resistance. In: Zambolini, L. Zambolini, E. M.; Várzea, V. M. P. (eds.), *Durable resistance to coffee leaf rust*, Minas Gerais, Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Fitopatologia, pp. 53-74.

VÁRZEA, V. M. P.; RODRIGUES JR., C. J.; SILVA, M. C.; GOUVEIA, M.; MARQUES, D. V.; GUERRA-GUIMARÃES, L.; RIBEIRO, A. (2002) - Resistência do cafeeiro à *Hemileia vastatrix*. In: Zambolim, L. (ed.) *O Estado da Arte de Tecnologias na Produção de Café*, Viçosa, Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Fitopatologia, pp. 297-320.

WALLER, J. M. (1985) - Control of Coffee Diseases. In : CLIFFORD, M. N. & WILSON, K. C. (eds.), *Coffee : Botany, Biochemistry and Production of Beans and Beverage*, Londres, Croom Helm, pp. 220, 225.

WALTERS, D. R. (2010) - *Plant Defense: Warding Off Attack by Pathogens, Herbivores and Parasitic Plants*, Reino Unido, Blackwell Publishing, pp.18-20.

WILSON, K. C. (1985) - Climate and Soil. *In* : CLIFFORD, M. N. & WILSON, K. C. (eds.), *Coffee : Botany, Biochemistry and Production of Beans and Beverage*, Londres, Croom Helm, pp. 101, 106.

**Webgrafia**

International Coffee Organization. Disponível em: <[http://www.ico.org/coffee\\_story.asp](http://www.ico.org/coffee_story.asp)>. Acesso em: 02 Fevereiro de 2010

Food and Agriculture Organization. Disponível em <<http://faostat.fao.org>>. Acesso em: 4 de Fevereiro de 2010

CABI DATABASES. Disponível em:  
<<http://www.speciesfungorum.org/Names/GSDSpecies.asp?RecordID=182962>>. Acesso em: 15 de Junho de 2010.